

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. med. C. Vogelmeier

des Fachbereichs

Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Marburg

Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in exhaliertem Atemwegskondensat

Inaugural-Dissertation zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sarah Elisabeth Noeske

aus Bad Soden

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
15.02.2011.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Professor Dr. med. M. Rothmund

Referent: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals

1.Korreferent: PD Dr. med. T. Stief

Meiner Großmutter Gertrud Noeske

* 25.09.1914

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	Alpha-1-Antitrypsin Mangel	3
1.1.1	Epidemiologie des Alpha-1-Antitrypsinmangels	3
1.1.2	Pathophysiologie des Alpha-1-Antitrypsinmangels	4
1.1.3	Klinik des Alpha-1-Antitrypsinmangels.....	7
1.1.4	Diagnostik.....	13
1.1.5	Therapie	16
1.2	Exhalieretes Atemwegskondensat.....	18
1.2.1	Zusammensetzung von exhalieretem Atemwegskondensat	18
1.2.2	Entstehungsort von exhalieretem Atemwegskondensat.....	18
1.2.3	Methodik der Gewinnung von exhalieretem Atemwegskondensat.....	19
1.2.4	Einflussfaktoren auf Zusammensetzung und Gewinnung von exhalieretem Atemwegskondensat.....	21
1.2.5	Reproduzierbarkeit	23
1.2.6	Marker der Inflammation und Mikroorganismen in exhalieretem Atemwegskondensat.....	24
2	Fragestellung	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Probanden, Ein-/Ausschlußkriterien.....	28
3.2	Untersuchungsablauf	30
3.3	Gewinnung von exhalieretem Atemwegskondensat	30
3.4	pH-Wert-Bestimmung in exhalieretem Atemwegskondensat.....	31
3.5	Western Blot Analyse.....	31
3.6	Alpha-1-Antitrypsin-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	32
3.7	Interleukin-8-ELISA.....	34
3.8	Statistische Analyse.....	34
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in exhalieretem Atemwegskondensat.....	35
4.1.1	Alpha-1-Antitrypsin ist im Western Blot nachweisbar	35
4.1.2	Alpha-1-Antitrypsin ist im ELISA nachweisbar	36
4.2	Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin im Exhalat von Patienten mit Alpha- 1-Antitrypsin-Mangel	37

4.3	Alpha-1-Antitrypsin-Werte im exhalieren Atemwegskondensat korrelieren nicht mit Alpha-1-Antitrypsin-Werten im Serum.....	39
4.4	Vergleich der Alpha-1-Antitrypsin-Werte im exhalieren Atemwegskondensat der verschiedenen Patientengruppen.....	40
4.5	Korrelation von Alpha-1-Antitrypsin-Werten mit Markern der pulmonalen Inflammation.....	43
4.5.1	COPD-Patienten und Patienten mit einer exazerbierten COPD haben signifikant niedrigere pH-Werte im exhalieren Atemwegskondensat als Gesunde	43
4.5.2	Die Interleukin-8-Werte bei Alpha-1-Antitrypsin-Patienten sind signifikant höher als bei COPD-Patienten und Gesunden.....	44
5	Diskussion	46
6	Zusammenfassung	57
7	Abstract.....	59
8	Literaturverzeichnis	61
9	Anhang.....	81

1 Einleitung

1.1 Alpha-1-Antitrypsin Mangel

Der Alpha-1-Antitrypsin Mangel (AAT-Mangel) ist eine genetische Erkrankung, die den Träger für die Entwicklung einer chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sowie einer Leberzirrhose prädisponiert. Erstmals wurde der AAT-Mangel von Laurell und Eriksson 1963 in Schweden beschrieben. Sie beobachteten bei jungen Patienten mit Lungenemphysem und schwerer COPD ein gehäuftes Fehlen der Alpha-1-Bande in der Serumelektrophorese (Eriksson, 1964; Laurell et al., 1963; Laurell et al., 1965).

1.1.1 Epidemiologie des Alpha-1-Antitrypsinmangels

Der AAT-Mangel tritt weltweit auf. Häufig wird der AAT-Mangel erst sechs bis acht Jahre nach Auftritt der ersten Symptome diagnostiziert. Basierend auf der umfangreichen Begutachtung weltweit durchgeführter Studien zur Prävalenz des AAT-Mangels beschreibt de Serres den AAT-Mangel als eine der häufigsten und schwerwiegendsten Einzelmutationen weltweit (de Serres, 2002). AAT-Mutationen werden in der weißen Bevölkerung Europas, genauso wie in Afrika, Nahost, Nordamerika, Australien und Zentralasien gefunden. De Serres postuliert, dass bei einer Gesamtpopulation von 4,4 Milliarden Menschen in 58 erfassten Ländern mindestens 116 Millionen Menschen den Phänotyp PiMZ und PiMS aufweisen und 3,4 Millionen Menschen Allelkombinationen zeigen, die zu einem AAT-Mangel führen (PiZZ, PiSZ oder PiSS). Dies entspräche einer Prävalenz von 1:1300 (de Serres, 2002).

In Europa wird die Prävalenz des homozygoten AAT-Mangels auf ungefähr 0,01 bis 0,02 % geschätzt. In Deutschland geht man von 12 000 homozygoten Merkmalsträgern aus, wovon etwa 4000 Personen manifest erkrankt sind (Van, 1993).

Die größte Studie zum Vorkommen des AAT-Mangels bei Neugeborenen wurde von Sveger in Schweden durchgeführt. Er untersuchte 200 000 Neugeborene in den Jahren 1972 bis 1974 und fand eine Prävalenz von 1:1 600 für den ZZ-Phänotyp (Sveger, 1978). Andere Studien mit kleineren Patientenkollektiven bewerteten die Prävalenz bei Neugeborenen jedoch geringer (Colp et al., 1993; Silverman et al., 1989).

Es ist zu beachten, dass die aufgeführten Daten eine Auswahl aus einem sehr heterogenen Kollektiv von verschiedenartigen Studien zur Epidemiologie des AAT-Mangels darstellen. Es ist davon auszugehen, dass ein Großteil aller Alpha-1 Antitrypsin-Gendefekträger nicht identifiziert ist oder unter anderen Diagnosen geführt wird. Diese Tatsache hat insofern Relevanz, als dass nicht identifizierte Merkmalsträger nicht die empfohlenen Präventionsmaßnahmen befolgen, wie zum Beispiel Nikotin- und Alkoholkarenz. Somit besteht die Gefahr einer früheren Krankheitsmanifestation und einer Verstärkung der Krankheitssymptome.

1.1.2 Pathophysiologie des Alpha-1-Antitrypsinmangels

Bei AAT handelt es sich um ein einkettiges Glykoprotein, das aus 394 Aminosäuren und drei an Asparagin gebundenen Seitenketten besteht. Sein Molekulargewicht beträgt 52 kDa. AAT wird durch das Protease-Inhibitor-Gen (PI-Gen) codiert, das sich auf dem langen Arm des Chromosoms 14 in der Region 14q32.1 befindet (Cox et al., 1982; Yamamoto et al., 1986). Es ist damit der Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren (SERPINE) zugehörig. Das Gen besteht aus vier kodierenden (2, 3, 4 und 5) und drei nichtkodierenden (1a, 1b und 1c) Exons sowie sechs Introns. Es hat eine Länge von 12,2 kb (Long et al., 1984).

Zu den SERPINEN zählen eine Reihe von strukturell ähnlichen Antiproteasen, wie zum Beispiel Angiotensinogen, kortikosteroid-bindendes Globulin, Thyroxin-bindendes Globulin, Alpha-1 Antichymotrypsin, Alpha-2 Antiplasmin, Plasminogen Aktivator-Inhibitor 1 und 2 und Antithrombin III (Billingsley et al., 1993).

Das AAT-Protein wird von Hepatozyten sezerniert. Auch mononukleäre Phagozyten, Epithelzellen des Intestinaltraktes und der Lunge sezernieren, wenn auch schwächer, AAT (Hafeez et al., 1992; Rollini et al., 2000). Das aktive Zentrum des Moleküls, das durch das Exon 5 kodiert wird, befindet sich in der Region der Aminosäure Methionin an Position 358 auf einer Oberflächenvorwölbung. Damit bildet das AAT-Molekül stabile Komplexe mit Proteasen, in deren aktivem Zentrum sich Serin befindet. Die Proteasen werden durch diese Komplexbildung inhibiert. Der Hauptgegenspieler des AAT-Proteins ist die humane neutrophile Elastase (HNE), welche von aktivierten und apoptotischen Neutrophilen Granulozyten sezerniert wird (Travis, 1988). Besonders in

der Lunge schützt das AAT-Molekül so das empfindliche Alveolargewebe vor der proteolytischen Wirkung von HNE (Brantly et al., 1991).

Das AAT-Molekül ist ein hoch pleomorphes Protein. Es wird durch über 100 verschiedene Allelvarianten codiert.

Bei der Mehrheit der Bevölkerung befinden sich die normalen nephelometrisch gemessenen AAT-Plasmaspiegel zwischen 100 und 200 mg/dl. Da AAT außerdem eine Funktion als „Akute-Phase-Protein“ besitzt, werden jedoch auch bei gesunden Menschen im Rahmen von Infektionen schwankende Plasmaspiegel gemessen.

Die verschiedenen AAT-Genotypen codieren für unterschiedliche AAT-Plasmaspiegel. Diejenigen Varianten, die Plasmaspiegel unter einem bestimmten Schwellenwert verursachen, gehen mit einem erhöhten Risiko einher, ein frühes Lungenemphysem zu entwickeln. Dieser protektive Schwellenwert wird bei 11 $\mu\text{mol/l}$ angegeben und entspricht nephelometrisch gemessen 50 mg/dl bzw. 80 mg/dl, wenn der Wert mittels der radialen Immundiffusion bestimmt wird. Diese Werte wurden basierend auf der retrospektiv beobachteten Tatsache festgelegt, dass Patienten mit heterozygoten Varianten des AAT-Mangels mit einem AAT-Plasmaspiegel oberhalb dieser Werte für gewöhnlich kein Lungenemphysem entwickelten (Stoller et al., 2005). Dies lässt sich durch eine bei einem AAT-Mangel entstehende Imbalance zwischen dem anti-proteolytischen Schutz des AAT-Proteins und der starken Aktivität der Leukozyten-Elastasen erklären. Elastin und andere Bestandteile des unteren Respirationstrakts können leichter angegriffen und zerstört werden (Gadek et al., 1981). Zudem wurden bei Patienten mit einem AAT-Mangel-Emphysem AAT-Polymere gefunden. Durch die Polymerisation wird die reaktive Schleife des AAT-Proteins unzugänglich gemacht und es resultiert eine Störung der inhibitorischen Aktivität (Elliott et al., 1998). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Oxidantien Methionin im aktiven Zentrum des AAT-Proteins zu Methioninsulfoxid umwandeln. Hierdurch resultiert eine wesentlich geringere Bindungsaffinität zur HNE (Beatty et al., 1980; Weiss et al., 1983). Zu den wichtigsten Oxidantien der Lunge zählen sowohl inhalierte Oxidantien aus der Umgebung, wie zum Beispiel Zigarettenrauch, wie auch die von Entzündungszellen produzierten Oxidantien Hydroxylradikal ($\text{OH}\bullet$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Beatty et al., 1980; Weiss et al., 1983). Durch die genannten Faktoren kommt zu der quantitativen Funktionsminderung eine qualitative Störung des AAT-Proteins hinzu.

Ursprünglich wurden die verschiedenen Varianten des AAT-Mangels nach der elektrophoretischen Beweglichkeit der AAT-Moleküle mit „F“ (fast), „M“ (medium), „S“ (slow) und „Z“ (very slow) benannt (Nowicki et al., 1990). Heute wird die Einteilung der Varianten aus klinischer Sicht nach den Plasmaspiegeln und der Funktion des AAT vorgenommen (2003):

Normalzustand: Plasmaspiegel über 20 µmol/L. Es handelt sich um den gewöhnlichen M-Typus, der bei 95 % der kaukasischen Bevölkerung vorliegt.

Mangelzustand: Plasmaspiegel unter 20 µmol/l. Man unterscheidet zwischen der Z-Variante, der S-Variante und selteneren Mangeltypen, die als „M-ähnliche“ oder „S-ähnliche“ Varianten eingeordnet werden.

Die Z-Variante (PiZZ) ist die häufigste Mangelvariante und hat bei homozygoten Merkmalsträgern Plasmaspiegel von 5 – 6 µmol/L. Dies entspricht 10-20% der Norm.

Die S-Variante (PiSS) tritt gehäuft in mediterranen Regionen auf und hat bei homozygoten Merkmalsträgern Plasmaspiegel von etwa 15 - 33 µmol/L (etwa 60 % der Norm).

Nullvariante: Bei dieser Variante kann überhaupt kein AAT im Blutplasma nachgewiesen werden, da kein AAT gebildet wird.

Dysfunktionale Varianten: Die Funktion des AAT-Moleküls an sich ist fehlerhaft. Bei der Variante „Pittsburgh“ ist die Funktion von einem Elastase-Inhibitor zu einem Thrombin-Inhibitor verschoben (Owen et al., 1983). Bei der „PI*F-Variante“ besteht hingegen eine stark reduzierte Affinität zu Elastase (Okayama et al., 1991).

Nachfolgend sind die wichtigsten Phänotypen mit den zugehörigen AAT-Plasmakonzentrationen aufgeführt:

Phänotyp	Einheiten	
	mg/dl	μM
PI*MM	150-350	20-48
PI*MZ	90-120	17-33
PI*SS	100-200	15-33
PI*SZ	75-120	8-16
PI*ZZ	20-45	2,5-7

Tab. 1: Phänotypen der wichtigsten AAT-Varianten und die zugehörigen AAT-Plasmakonzentrationen. Modifiziert nach ATS/ERS (Stoller et al., 2005).

1.1.3 Klinik des Alpha-1-Antitrypsinmangels

Der AAT-Mangel manifestiert sich klinisch in Form eines Lungenemphysems, einer chronischen Bronchitis, einer Lebererkrankung und seltener in Form von Hauterkrankungen (Kueppers et al., 1974; Morse, 1978b; Morse, 1978a).

Lungenerkrankung bei Alpha-1-Antitrypsinmangel

Die hauptsächliche klinische Manifestation des schweren AAT-Mangels ist die chronische obstruktive Lungenerkrankung (COPD) und zeigt sich verstärkt im unteren Respirationstrakt in Form eines basal betonten Lungenemphysems (1997). Das Lungenemphysem bei AAT-Mangel hat im Gegensatz zu dem zentroazinären Lungenemphysem bei COPD eine panazinäre Struktur und tritt, verglichen mit COPD Patienten ohne AAT-Mangel, schon in deutlich jüngerem Alter auf. Sogar bei einem Kind mit AAT-Mangel, das an den Folgen einer Leberzirrhose starb, wurde schon ein panazinäres Lungenemphysem nachgewiesen (Glasgow et al., 1973). Das durchschnittliche Manifestationsalter liegt zwischen 32 und 41 Jahren (2003). Meistens haben diese Patienten geraucht (Brantly et al., 1988; Janus et al., 1985; Rawlings, Jr. et al., 1976; Tobin et al., 1983). Trotzdem ist der Auftrittszeitpunkt der ersten Beschwerden sehr variabel und wurde nur selten vor dem 25. Lebensjahr beschrieben. Jedoch zeigten viele Nichtraucher und auch einige Raucher überhaupt keine Symptome wie Müdigkeit, Dyspnoe, Abgeschlagenheit, Husten und Giemen (Stoller et al., 1994; Wall et al., 1990).

Es wurden viele Studien zu AAT Registern publiziert, in denen auch Symptome retrospektiv abgefragt wurden. Das größte Patientenkollektiv existiert mit 1129 Patienten im NHLBI-Register, in dem Patienten mit einer AAT-Serumkonzentration von $<11\mu\text{M}$ und asymptomatische AAT-Mangelpatienten untersucht wurden (McElvaney et al., 1997). Im Folgenden sind die am häufigsten von den Patienten angegebenen Symptome dargestellt:

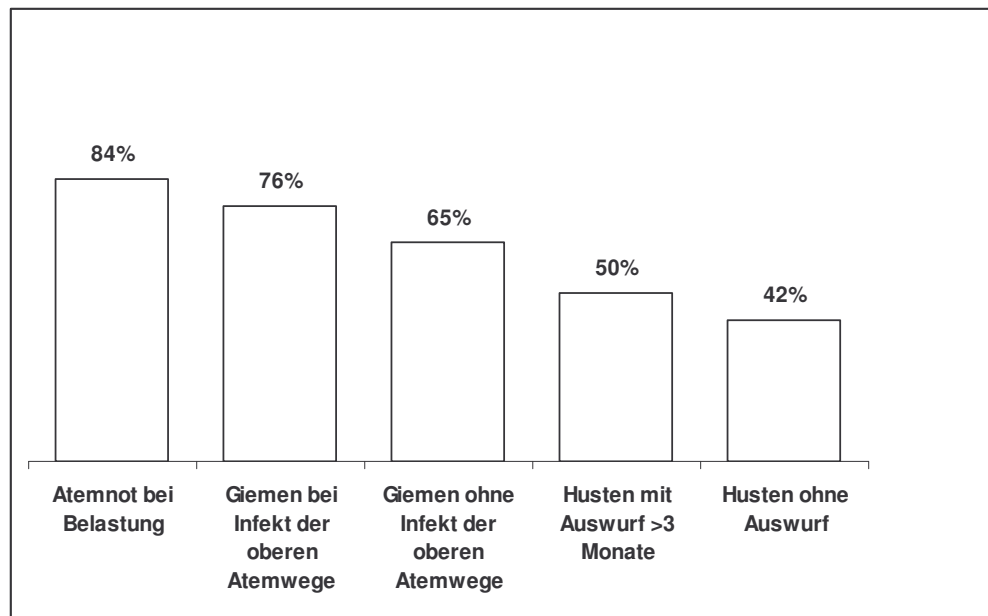


Abb.1: Angegebene Symptome der Patienten des NHLBI-Registers.

Modifiziert nach McElvaney et al.(McElvaney et al., 1997)

In anderen Studien diagnostizierte man bei 8-40 % der Patienten mit AAT-Mangel einen, einer chronischen Bronchitis ähnlichen, chronischen produktiven Husten über drei Monate in zwei aufeinander folgenden Jahren (Eden et al., 1997; Piitulainen et al., 1998a; Shin et al., 1993). Bei Patienten mit chronischem Husten konnten zum Teil auch Bronchiektasen nachgewiesen werden (Shin et al., 1993). Es gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem AAT-Mangel und dem Auftreten von Asthma bronchiale. Bei vielen AAT-Patienten kann man allergische und asthmatische Symptome diagnostizieren. So fanden Eden et al. Atopie, gutes Ansprechen auf Bronchodilatoren, Giemen und erhöhte IgE Serumwerte bei 22 % der untersuchten AAT-Mangelpatienten (Eden et al., 1997). McElvaney et al. beobachteten bei 50 % der untersuchten AAT-Patienten eine deutliche Verbesserung einer vorhandenen Atemwegsobstruktion nach Gabe von Bronchodilatoren (McElvaney et al., 1997). So

wird verständlich, dass Asthma bronchiale eine häufige Fehldiagnose bei AAT-Mangel ist (2003).

In Röntgenaufnahmen und Computertomographie-Bildern findet man bei fortgeschrittener Erkrankung eine erhöhte Strahlentransparenz, einen vermehrten retrosternalen Luftgehalt der Lunge, eine Abflachung des Zwerchfells, Gefäßrarefizierungen und Bullae, und zwar besonders in den basalen Lungenabschnitten. Diese Zeichen werden auch bei Patienten mit COPD ohne AAT-Mangel gefunden, jedoch mit vorwiegendem Befall der Lungenoberlappen (Beinert et al., 1995; Foster, Jr. et al., 1993; Gishen et al., 1982; Guest et al., 1992). Bei wenigen Patienten wurden auch Bronchiektasen gefunden. Sie traten vor allem in Bereichen der Lunge auf, die schon stark emphysematös befallen waren (Cuvelier et al., 2000).

Bisher war die Standardmethode, um das Voranschreiten des Lungenemphysems zu verfolgen, die Lungenfunktionsuntersuchung. Hierzu wird hauptsächlich das Atemmanöver, insbesondere der Abfall des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde (FEV_1), als Parameter verwendet. Dieser Parameter ist unphysiologisch aber gut reproduzierbar (Enright et al., 1995; Jensen et al., 2007). Der jährliche Abfall der FEV_1 bei gesunden Individuen beträgt 30 ml, wohingegen es bei Patienten mit AAT-Mangel zu einem jährlichen Abfall von ungefähr 60 ml kommt. Wahrscheinlich ist jedoch die densitometrische Beurteilung von CT-Bildern eine sensitivere und spezifischere Methode, um eine Verlaufsbeurteilung des Lungenemphysems zu machen (Bakker et al., 2005; Dirksen et al., 1999; Muller et al., 2002; Soejima et al., 2000). Stolk et al. untersuchten 144 Patienten mit mildem bis schwerem Lungenemphysem, wovon 87 Patienten einen homozygoten oder heterozygoten AAT-Mangel hatten. Es konnte gezeigt werden, dass das Voranschreiten des Emphysems mittels CT-Densitometrie um das 2,5-fache sensibler dargestellt werden kann als es mit den derzeit gebräuchlichen Lungenfunktionsparametern möglich ist (Stolk et al., 2007).

Interessanterweise entspricht die Atemwegsobstruktion bei Patienten mit AAT-Mangel nicht automatisch dem Ausmaß der Lungenparenchymzerstörung. Manche Patienten haben ein schweres Lungenemphysem mit nur gering eingeschränkter Lungenfunktion, wohingegen andere Patienten eine starke Atemwegsobstruktion mit nur wenig emphysematös umgebautem Gewebe zeigen (Needham et al., 2004).

All diese Symptome, die sich bei jedem AAT-Patienten in unterschiedlicher Ausprägung manifestieren, führen zu einer sehr frühen Einschränkung der Lebensqualität. Schon in einem mittleren Alter von 46 Jahren gaben 30 % der Patienten der NHLBI-Studie eine enorme Behinderung durch ihre Krankheit an. Das Lungenemphysem stellt mit 72 % die häufigste Todesursache der AAT-Patienten dar (McElvaney et al., 1997).

Lebererkrankung bei Alpha-1-Antitrypsinmangel

Bei einer wesentlich geringeren Anzahl an Patienten existiert im Zusammenhang mit AAT-Mangel eine Lebererkrankung. 1969 beschrieben Sharp et al. erstmalig eine Leberzirrhose bei AAT-Mangel bei zehn Kindern aus sechs Familien (Sharp et al., 1969).

Es existieren verschiedene Theorien zur Entstehung dieser Erkrankung bei Patienten mit homozygotem AAT-Mangel (PI*ZZ). Es kommt zu einer Akkumulation von AAT in den Hepatozyten, die den Hauptsyntheseort des AAT-Proteins darstellen. Nach der „Akkumulationstheorie“ wird bei homozygoten AAT-Patienten zwar eine ausreichende Menge an fehlerhaftem AAT gebildet, es werden aber nur 15 % davon sezerniert. 85 % verbleiben in den Hepatozyten und zeigen sich dort histologisch als globuläre, mittels PAS anfärbbare, Einschlusskörper. Man findet sie besonders in der Periportalregion (Qizilbash et al., 1983). Es wurde gezeigt, dass das AAT-Protein durch eine Änderung der Peptid-Konformation, einer so genannten „loop-sheet“-Bindung, polymerisiert und deswegen nicht in den Golgi-Apparat gelangen kann. Vielmehr verbleibt es im endoplasmatischen Retikulum, wo es akkumuliert und auch degradiert wird (Lomas et al., 1992; Marcus et al., 1998; Teckman et al., 1996b; Teckman et al., 1996a).

In den Hepatozyten wird zudem der Phänotyp des AAT-Proteins festgelegt. Wird beispielsweise einem AAT-Mangelpatienten eine Leber transplantiert, misst man nach kurzer Zeit bei dem Empfänger die AAT-Serumwerte, die dem Genotyp des Spenders entsprechen (Combs et al., 1997; van et al., 1986).

Außerdem führt wahrscheinlich auch eine Entzündung der Leber zu vermehrtem Auftreten von Einschlusskörpern. Je mehr Einschlusskörper vorliegen, desto schwerer ist die Leberzirrhose (Zhou et al., 2000a).

Es wurden eine prospektive und mehrere retrospektive Studien zum Auftreten einer Lebererkrankung bei Kindern mit AAT-Mangel durchgeführt. Es wurde deutlich, dass nur Kinder mit homozygotem AAT-Mangel (PI*ZZ) eine Leberzirrhose entwickelten und diese bei > 90 % schon im ersten Lebensjahr manifest wurde. Manche Kinder hatten einen prolongierten Neugeborenenikterus und eine Hepatomegalie (Ibarguen et al., 1990; Nemeth, 1999; Prachalias et al., 2000; Volpert et al., 2000). Im Allgemeinen sind der Verlauf und die Prognose des Leberbefalls bei AAT-Mangel günstig.

Auch in der Adoleszenz besteht die Möglichkeit zur Entwicklung einer Leberzirrhose. Errikson fand dazu eine Prävalenz von 50 % bei Personen im Alter über 50 Jahre. Wahrscheinlich besteht die Krankheit jedoch schon in der Kindheit und ist, wie auch bei Kindern beobachtet, nur langsam progredient (Eriksson, 1999). Neueren Studien zufolge kann auch eine heterozygote Variante des AAT-Mangels zu einer Zirrhose führen (Eigenbrodt et al., 1997). Homozygote sowie auch heterozygote AAT-Mangelpatienten tragen außerdem ein erhöhtes Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken (Eigenbrodt et al., 1997; Elzouki et al., 1996; Zhou et al., 2000b). Dabei muss für die Entwicklung eines Karzinoms nicht zwangsläufig eine Leberzirrhose vorhanden sein (Zhou et al., 1998). Die Lebertransplantation ist die Therapie der Wahl bei fortgeschrittener dekompenzierter Leberzirrhose bei AAT-Mangel.

Andere Erkrankungen bei AAT-Mangel

Neben den oben beschriebenen klinischen Hauptmanifestationen wird der AAT-Mangel mit einer Reihe weiterer Krankheitsbilder in Verbindung gebracht.

Es existieren mehrere Fallberichte zum vermehrten Auftreten von systemischen Vaskulitiden und Glomerulonephritiden bei schwerem AAT-Mangel, wie zum Beispiel der Purpura Schönlein-Henoch (Elzouki et al., 1995; Fortin et al., 1991; Levy, 1986; Lewis et al., 1985). Es konnte eine Verbindung zwischen der heterozygoten und homozygoten Form des PI-Z-Mangels und dem Auftreten von C-ANCA (Anti-Proteinase-3) gefunden werden. In Wegener-Patienten konnte eine erhöhte Frequenz des PiZ-Allels nachgewiesen werden. (Baslund et al., 1996; Elzouki et al., 1994; Esnault et al., 1993; Savige et al., 1995).

Bei Kindern wurden verschiedene Glomerulonephritiden mit dem AAT-Mangel in Verbindung gebracht. Davis et al. fanden bei 15 von 20 untersuchten Kindern mit auf einem AAT-Mangel beruhenden Lebererkrankung glomeruläre Veränderungen.

Besonders häufig wurde eine mesangiokapilläre Glomerulonephritis gefunden. (Davis et al., 1992). Weiterhin wurde bei einer Person mit homozygotem AAT-Mangel, die sich einer Lebertransplantation unterzog, gezeigt, dass nach dem Eingriff eine drastische Verbesserung der renalen Symptome stattfand (Elzouki et al., 1997).

Es fanden sich bei AAT-Patienten vermehrt eine Reihe von Hauterkrankungen, wie z.B. die Psoriasis, Urtikaria und Pannikulitis (1997). Es handelt sich bei der Pannikulitis um entzündliche und nekrotisierende Veränderungen der Haut und des Subkutangewebes, die sich typischerweise als harte, rote und schmerzhaftige Knoten an Oberschenkeln und Gesäß zeigen. Die Pannikulitis kann über verschiedene Ausprägungsgrade hinweg bis zum Tod führen (Smith et al., 1989; Warter et al., 1972). Die Zahl der publizierten Fälle von AAT Patienten mit Pannikulitis beläuft sich aber aktuell auf nur etwa 50.

Bei der Psoriasis fanden Beckman et al. ein signifikant häufigeres Vorkommen bei AAT-Patienten (Beckman et al., 1980). Es gibt Hinweise darauf, dass AAT-Patienten schwerere Verläufe und einen früheren Erkrankungsbeginn haben. (Heng et al., 1985).

Wenige Daten belegen eine Assoziation von AAT-Mangel mit bestimmten Formen der Urtikaria. Bei der Untersuchung von 281 Patienten mit chronischer Urtikaria fand man ein erhöhtes Vorkommen des MZ-Phänotyps und eine erhöhte Frequenz des Z-Allels. Dabei herrschte das Z-Allel bei Patienten mit Kälteurtikaria und erworbenem Angioödem vor (Doeglas et al., 1985).

Die Beschreibung der oben genannten Krankheitsbilder, die im Zusammenhang mit einem AAT-Mangel beobachtet wurden, beruht auf wenigen Studien mit kleinen Patientenkollektiven, sodass die Durchführung von neuen Studien mit kontrollierten und prospektiven Erhebungen von Nöten ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass es zu solchen Studien kommt, ist aufgrund der geringen Patientenzahlen jedoch sehr gering.

Risikofaktoren

Es existieren zahlreiche Studien zum Einfluss verschiedener Risikofaktoren auf die Entwicklung einer COPD bei Patienten mit einem homozygoten AAT-Mangel. Hierbei handelt es sich sowohl um Umweltfaktoren als auch um wirtsspezifische Faktoren, die jedoch bei verschiedenen Individuen zu einem unterschiedlichen Manifestationsgrad des jeweiligen Krankheitsbildes führen können.

Es ist bewiesen, dass Rauchen der wichtigste Risikofaktor zur Entwicklung eines Lungenemphysems bei Patienten mit AAT-Mangel und zur Ausbildung einer COPD ist. Es besteht eine deutlich beschleunigte Abnahme der jährlichen FEV₁ bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern und auch Exrauchern (Hutchison, 1988; Seersholm et al., 1995). Dabei konnten Piitulainen und Eriksson zeigen, dass Nichtraucher und Exraucher einen ungefähr gleichen jährlichen Abfall der FEV₁ haben (Piitulainen et al., 1999). Gibt ein Raucher das Zigarettenrauchen auf, sinkt die jährliche Abnahme der FEV₁ wieder auf das Niveau eines Nichtrauchers (Seersholm et al., 1995). Bedeutsam ist auch, dass bereits Rauchen vor dem 18. Lebensjahr und sogar „parenterales Rauchen“ (intrauteriner Rauchkontakt) zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion führen (Piitulainen et al., 1998a). Die Exposition gegenüber Passivrauchen ist ebenfalls schädlich (Piitulainen et al., 1998a; Piitulainen et al., 1998b).

Auch Atemwegsinfekte können die pulmonale Situation bei AAT-Mangel verschlechtern. Dabei führen Exazerbationen bei Patienten mit leichter oder mittlerer Atemwegsobstruktion zu einer signifikanten Abnahme der FEV₁. Deswegen ist es besonders wichtig, die Häufigkeit solcher Exazerbationen zu reduzieren und sorgfältig zu behandeln (Dowson et al., 2001).

Ebenfalls können verschiedene Umwelttoxene wie zum Beispiel das Heizen mit Kerosin oder das Arbeiten in der Landwirtschaft sowie verschiedene Stäube und Gase das Voranschreiten eines Lungenemphysems bei Nichtrauchern mit AAT-Mangel beschleunigen (Piitulainen et al., 1998b).

1.1.4 Diagnostik

Der AAT-Mangel zählt zu den Krankheitsursachen, die häufig erst nach einer langen Krankheitsgeschichte oder auch gar nicht erkannt werden. Laut einer von Wulfsberg et al. durchgeführten Studie beträgt das durchschnittliche Alter bei der Diagnosestellung eines AAT-Mangels 41 Jahre, wobei die pulmonale Symptomatik des Patienten meist schon 5,7 Jahre besteht. Bis die richtige Diagnose gestellt wird, müssen die Patienten oft mindestens drei verschiedene Ärzte konsultieren, wobei zum Teil bis zu zehn Ärzte aufgesucht wurden (Wulfsberg et al., 1994). Eine sorgfältige Anamneseerhebung und umfassende Diagnostik bei verdächtigen Patienten ist deshalb von besonderer Bedeutung.

Bei der körperlichen Untersuchung ist zu beachten, dass sich die charakteristischen Manifestationsmerkmale einer chronischen Bronchitis bei einem AAT-Mangel, wie zum Beispiel abgeschwächte Atemgeräusche und Lungenemphysem, nicht von denen einer chronischen Bronchitis durch Nikotinabusus oder Umwelttoxinen unterscheiden. Zu beachten ist jedoch, dass diese Merkmale im Gegensatz zu Patienten mit COPD anderer Genese schon zwischen dem 30. und 40. Lebensjahrzehnt auftreten, das heißt also rund 20 Jahre früher.

Neben Anamnese und klinischer Untersuchung kann bei Verdacht auf einen AAT-Mangel eine Serumbestimmung von AAT, eine Lungenfunktion, eine arterielle Blutgasanalyse, Bildgebung mittels konventionellem Röntgen und Computertomographie und eventuell auch eine Ventilations-/Perfusionsszintigraphie durchgeführt werden.

Die ATS/ERS empfiehlt bei folgenden Patienten eine AAT-Diagnostik (2003):

Empfehlungen zur weiteren Abklärung auf AAT-Mangel	
1.	Fehlen der AAT-Zacke in der Serumelektrophorese
2.	Früh aufgetretenes Lungenemphysem (unabhängig von Rauchverhalten)
3.	Bekannter AAT-Mangel in der Familie
4.	Vorkommen von Dyspnoe und Husten bei mehreren Familienmitgliedern der gleichen oder unterschiedlichen Generation
5.	Lebererkrankung unbekannter Genese
6.	Alle Patienten mit COPD
7.	Erwachsene mit Bronchiektasen unbekannter Genese*
8.	Asthmapatienten, deren Atemwegsobstruktion sich auch unter Therapie spirometrisch nicht normalisiert
9.	Panniculitis und C-ANCA-Vaskulitis unklarer Genese

Tab. 2: Indikationen, bei denen eine weitere Abklärung auf AAT-Mangel empfohlen wird.

Modifiziert nach ATS/ERS (2003). *Bei Personen mit Bronchiektasen unklarer Genese sollte eine Testung auf AAT-Mangel in Betracht gezogen werden. Die Empfehlung berücksichtigt die Tatsache, dass der AAT-Mangel unterdiagnostiziert ist, dass in einigen Publikationen Bronchiektasen häufig mit AAT-Mangel in Verbindung gebracht werden aber dass diese Assoziation nicht eindeutig erwiesen ist.

Ein Stufenkonzept zur Diagnostik könnte wie folgt aussehen (Koczulla et al., 2008a):

Zur Abklärung eines AAT-Mangels kann vorerst eine quantitative Untersuchung der AAT-Serumkonzentration mittels Nephelometrie durchgeführt werden. Hierbei wird die AAT-Konzentration über eine spezifische Lichtstreuungstechnik bestimmt. Eine Genotypisierung mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) sollte ebenfalls durchgeführt werden. Typisch auftretende Banden können mit standardisierten Kontrollen verglichen werden.

Finden sich Hinweise für genetische Abweichungen vom Genotyp PiMM oder erniedrigte AAT-Spiegel in der nephelometrischen Untersuchung, sollte eine Phänotypisierung mittels der isoelektrischen Fokussierung (IEF) durchgeführt werden (Abb.2).

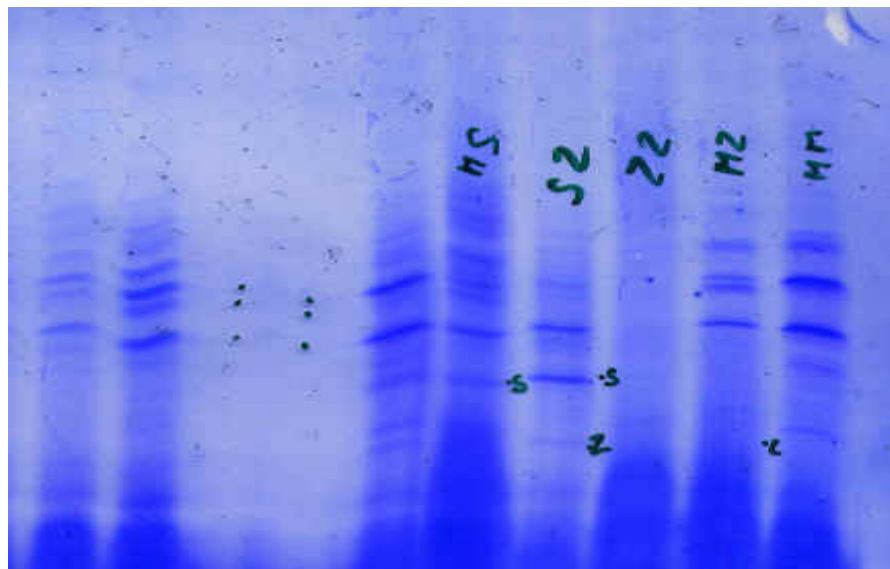


Abb. 2: Isoelektrische Fokussierung. Beispiele für den Normaltyp (MM) und AAT-Mutationen (MZ, ZZ, SZ, MS) sind markiert.

Wenn PCR und IEF nicht eindeutig zu beurteilen sind oder der Verdacht auf einen seltenen Genotyp besteht, kann eine Sequenzierung mit Serum und EDTA-Blut durchgeführt werden.

Es ist zu beachten, dass das AAT-Protein auch als Akute-Phase-Protein fungiert und bei Entzündungssituationen erhöht sein kann. Dies kann bei heterozygoten AAT-

Patienten mit einem mittelschweren Mangel zu einem falsch gemessenen normalen AAT-Serumspiegel führen. Deswegen sollte das C-reaktive Protein (CRP) mitbestimmt werden und die AAT Bestimmung sollte im infektionsfreien Intervall erfolgen.

1.1.5 Therapie

Präventive Maßnahmen, wie z.B. das Aufgeben des Rauchens, stellen wichtige Maßnahmen dar. Wie oben schon beschrieben ist es erwiesen, dass sich der jährliche FEV₁-Abfall bei Personen, die das Rauchen erfolgreich aufgeben, signifikant verringert (Anthonisen et al., 1994). Auch die Exposition gegenüber passivem Zigarettenrauchen, Atemwegsnoxen sowie Staub und Rauch sollte so gering wie möglich gehalten werden. Unter Umständen muss ein Arbeitsplatzwechsel empfohlen werden.

Zur Vorbeugung schwerer Infektionen der Atemwege und der Lunge werden die Influenza- und Pneumokokken-Impfung empfohlen. Eine Hepatitis-Impfung wird bei Patienten mit AAT-Mangel und gesicherter Lebererkrankung angeraten (2003).

Entsprechend der Hauptmanifestation des AAT-Mangels in der Lunge orientiert sich die medikamentöse und nichtmedikamentöse Therapie des AAT-Mangels an den Leitlinien zur Therapie von Erkrankungen mit COPD (2006;Vogelmeier et al., 2007).

Laut der von der ATS/ERS herausgegebenen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie bei Patienten mit AAT-Mangel (2003) wird die Augmentationstherapie mit humanem AAT bei Patienten mit einem initialen FEV₁ von 31 – 65 % des Sollwertes empfohlen. Dabei soll eine wöchentliche Gabe von 60 mg/kg Körpergewicht AAT-Konzentrat erfolgen, da der AAT-Spiegel nach einer Woche unter den Schutzspiegel von nephelometrisch gemessen 50 mg/dl fällt (Schmidt et al., 1988;Stoller et al., 2002). Eine weitere Empfehlung zur Substitutionstherapie besteht auch bei einem FEV₁-Verlust von > 120 ml/Jahr.

Es ist zu betonen, dass die Wirksamkeit der AAT-Augmentationstherapie nicht in prospektiv randomisiert kontrollierten Studien nachgewiesen worden ist. In zwei nicht randomisierten Übersichtsarbeiten konnte aber eine Reduktion des Lungenfunktionsverlustes sowie eine Verringerung der Mortalität bei Patienten mit einer niedrigen FEV₁ unter der Therapie gezeigt werden (Seersholm et al., 1997;Wencker et al., 1998). Vor diesem Hintergrund konnten Dirksen et al. die CT-

Densitometrie als eine sehr sensitive Methode zum Wirksamkeitsnachweis der Substitutionstherapie darstellen (Dirksen et al., 1999).

Außerdem äußerten Stockley et al. in einer 2002 durchgeführten Studie die Vermutung, dass die Substitution von AAT eine Inflammation der Atemwege vermindert (Stockley et al., 2002). Liebermann et al. beschrieben eine Reduktion von Häufigkeit und Schwere von Atemwegsinfektionen unter AAT-Substitutionstherapie sowie eine Verringerung von Lungenfunktionseinschränkungen und Mortalität (Lieberman, 2000). Im Rahmen der 2009 veröffentlichten Ergebnisse der EXACTLE-Studie konnte nun gezeigt werden, dass die Substitution mit humanem AAT zwar nicht die Häufigkeit von Exazerbationen reduziert, jedoch zu einer Verminderung der Schwere der Exazerbation führt (Dirksen et al., 2009).

Als neue therapeutische Ansätze in der Substitutionstherapie sind die inhalative Substitutionstherapie, die Behandlung mit rekombinantem AAT und die Therapie mit synthetischen Elastasehemmern zu erwähnen. Diese Therapieformen sind jedoch noch nicht in die gegenwärtig praktizierten Behandlungsstrategien aufgenommen.

Für AAT-Patienten mit einem Lungenemphysem im Endstadium ist die Lungentransplantation eine mögliche Option (Hosenpud et al., 1995). Eine Lungenvolumenreduktion (LVR) wird teilweise ebenfalls versucht. Es ist jedoch fragwürdig, ob eine LVR bei Emphysempatienten mit AAT-Mangel die gleichen Verbesserungen erzielt wie bei Patienten mit „gewöhnlichem“ Emphysem (2001;Cassina et al., 1998;Cooper et al., 1996;Gelb et al., 1999). Auch mit der Durchführung der Bullektomie soll eine funktionelle Besserung durch Entlastung des komprimierten Lungengewebes und durch die Wiederherstellung des Kopplungsmechanismus zwischen Zwerchfell und Lunge erreicht werden (Graf et al., 1991). Die langfristigen Resultate sind aber auch hier eher enttäuschend, sodass nur noch sehr sorgfältig ausgewählte Patienten einer solchen chirurgischen Therapie zugeführt werden.

1.2 Exhalierteres Atemwegskondensat

Es gibt viele Möglichkeiten, um Untersuchungsgut aus den Atemwegen und dem Lungenparenchym zu gewinnen, Erkrankungen zu diagnostizieren und Entzündungsgeschehen in der Lunge zu charakterisieren. Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) stellt in der klinischen Diagnostik und Behandlung vieler Lungenerkrankungen den Goldstandard dar (Haslam et al., 1999).

Eine Methode, um nicht-invasiv Informationsmaterial aus der Lunge zu erhalten, ist das exhalierteres Atemwegskondensat (EBC). Sidorenko et al. beschrieben diese Methode erstmals zu Beginn der 80er Jahre (Sidorenko et al., 1980). Die EBC-Diagnostik erlaubt einen nicht-invasiven, reproduzierbaren und dabei einfachen und kostengünstigen Zugang zur Lunge. Ein weiterer Vorteil gegenüber der BAL ist die Möglichkeit, die Untersuchung ohne den Einsatz von Medikamenten durchzuführen und die fehlende Verdünnung durch Spüllösungen (Haslam et al., 1999).

1.2.1 Zusammensetzung von exhalierterem Atemwegskondensat

EBC wird durch Kondensation der Ausatemluft an kühlen Oberflächen gewonnen. Es besteht zu > 99 % aus Wasserdampf. Im EBC lassen sich jedoch auch Proteine bis zu einer Größe von 50 kD, Mediatoren wie z.B. Leukotriene, Interleukine, TNF-alpha, Thromboxan B2, verschiedene Tumor-Marker (CEA, SCC, CYFRA, TPA-M) und DNA nachweisen (Effros et al., 2002; Kietzmann et al., 1993; McCafferty et al., 2004; Scheideler et al., 1993). Die Aerosolfraktion wird höchst wahrscheinlich aus der extrazellulären Flüssigkeit, die sich auf der Epithelschicht der Atemwege und Alveolen befindet (epithelial lining fluid; ELF), gebildet (Mutlu et al., 2001). Die Anzahl an freigesetzten Aerosolpartikeln liegt zwischen 0,1 bis 4 Partikel/cm³ mit einem mittleren Diameter von 0,3 µm (Fairchild et al., 1987; Fritter et al., 1991; Papineni et al., 1997).

1.2.2 Entstehungsort von exhalierterem Atemwegskondensat

Die genaue Quelle von EBC ist bisher nicht bekannt. Obwohl es wahrscheinlich ist, dass in EBC sowohl Bestandteile aus dem oberen als auch aus dem unteren Respirationstrakt enthalten sind, konnte eine genaue Zuordnung des EBCs zu dem Produktionsort bisher nicht mit Sicherheit erfolgen.

In wenigen Studien wurden EBC-Proben, die durch ein Tracheostoma gewonnen wurden, mit Proben, die direkt durch den Mund gewonnen wurden, verglichen. Sowohl die gemessenen pH-Werte als auch die Konzentrationen von Adenosin und Thromboxan B₂ unterschieden sich nicht signifikant (Vass et al., 2003; Vaughan et al., 2003).

Des Weiteren wurden in unabhängigen Studien aus den beiden oben beschriebenen Quellen die gleichen Marker, Hydrogenperoxid (H₂O₂) und 8-Isoprostan bestimmt. Obwohl die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen wurden, wurden ähnliche Werte gemessen (Carpenter et al., 1998; Kietzmann et al., 1993; Montuschi et al., 1999; Nowak et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese EBC-Marker im unteren Atemwegstrakt gewonnen werden.

Weitere Hinweise darauf, dass EBC sowohl im Alveolarbereich wie auch in den kleinen Atemwegen entsteht, fanden Jackson et al. Sie verglichen erstmals Biomarker in EBC und BAL in vivo. Sie untersuchten Keratin, das von Epithelzellen exprimiert wird, und Phospholipid (PL), das hauptsächlich ein Bestandteil des Surfactants ist. Da sie signifikant höhere PL-Werte in EBC als in der BAL fanden, gehen sie davon aus, dass mit der Methode des EBCs die Alveolen und damit der gesamte untere Respirationstrakt besser abgebildet werden, als bisher angenommen (Jackson et al., 2007).

Im Gegensatz dazu konnten Effros et al. zeigen, dass der Gehalt an Ammoniak im EBC, das über ein Tracheostoma gewonnen wurde, wesentlich geringer ist als in EBC-Proben, die oral gewonnen wurden. Dies würde für eine stärkere Beteiligung der oberen Atemwege an der Zusammensetzung von EBC sprechen (Effros et al., 2002; Vass et al., 2003). Als ein dominanter Einflussfaktor auf die Zusammensetzung von EBC kann Saliva ausgeschlossen werden (Effros et al., 2002; Griesse et al., 2002).

1.2.3 Methodik der Gewinnung von exhaliertem Atemwegskondensat

Es gibt nur wenige standardisierte Empfehlungen zur Sammlung von EBC.

Es existieren zum gegenwärtigen Zeitpunkt verschiedene Geräte zur Gewinnung von EBC. Wurden anfänglich selbstentwickelte Geräte benutzt, bei denen durch einen Kunststoffschlauch geatmet wurde, der durch ein Eisbad geführt wurde, werden heute in den Arbeitsgruppen, die sich mit EBC beschäftigen, vor allen Dingen der ECoScreen™ I und II (Jaeger, Würzburg, Deutschland) (zur Zeit nicht mehr in

Produktion) und transportable Geräte wie der ECOScreen Turbo™ (VIASYS Healthcare GmbH, Höchberg, Deutschland) und das RTube™ (Respiratory Research, Charlottesville, Virginia, USA) benutzt. Prinzip aller Geräte ist die Kondensation von Ausatemluft an gekühlten Oberflächen.



a)



b)



c)



d)

Abb. 4: Geräte zur Gewinnung von exhalierem Atemwegskondensat. Gebräuchlich sind heute hauptsächlich der ECoScreen I™(a), der EcoScreen II™(b), das RTube™(c) und der ECoScreen Turbo™(d).

Bei dem Gerät ECoScreen I™ wird in ein 10 cm langes Sammelrohr geatmet, in dem die Ausatemluft durch ein umgebendes Kühlsystem abgekühlt wird. Der EcoScreen

IITM ermöglicht eine fraktionierte Gewinnung von EBC aus dem Respirationstrakt mit Hilfe von zwei getrennten Kollektoren. Der ECoScreen TurboTM ist deutlich kleiner und kühlt konstant auf $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Das RTubeTM ist ein austauschbares System und besteht aus einem Mundstück, das über eine Einwegklappe mit einem Sammelrohr aus Kunststoff verbunden ist. Dieses wird von außen mit einem Aluminiumrohr gekühlt.

Ein Vorteil des RTubeTM ist die einfache Handhabung und die leichte Transportierbarkeit, was es ermöglicht, schnell und flexibel Patienten sowohl in der Notaufnahme, wie auch auf Station oder in diagnostischen Einrichtungen wie der Lungenfunktion zu messen.

Es gibt wenige Daten über die Vergleichbarkeit der einzelnen kommerziellen Geräte. Die meisten existierenden Arbeiten vergleichen das RTubeTM mit dem ECoScreen ITM. Koczulla et al. beispielsweise fanden bei dem Vergleich der beiden Geräte keinen signifikanten Unterschied in den pH-Werten im EBC (Koczulla et al., 2008b). Soyer et al. fanden ebenfalls diese Ergebnisse, konnten aber mehr Volumen mit dem ECoScreen ITM als mit dem RTubeTM gewinnen. Zusätzlich fanden sie in EBC-Proben, die mit dem ECoScreen ITM gewonnen worden waren, höhere Konzentrationen an Cysteinyl Leukotrienen und Eotaxin als in Proben, die mit dem RTubeTM gesammelt worden waren (Soyer et al., 2006).

1.2.4 Einflussfaktoren auf Zusammensetzung und Gewinnung von exhaliertem Atemwegskondensat

Temperatur

Die programmierte Temperatur zur Gewinnung von EBC mit Hilfe des ECoScreenTM beträgt $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Aluminiumrohr des RTubeTM wird häufig auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlt. Es wärmt sich jedoch während einer Sammelzeit von 10 min auf $+15 - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf. Wegen den unterschiedlichen Temperaturempfehlungen erscheint es wichtig, die Sammeltemperatur genau anzugeben.

Sammelzeit

Die ATS/ERS (Horvath et al., 2005) empfiehlt eine EBC-Sammelzeit von ca. 10 min. Durch Tidalatmung über diesen Zeitraum können 1-2 ml EBC sowohl von Erwachsenen als auch von Kindern über vier Jahren gewonnen werden, ohne einen Erschöpfungszustand bei der betreffenden Person zu induzieren. Die Konzentration der Bestandteile im EBC wird aber wahrscheinlich auch durch einen längeren Sammelzeitraum nicht beeinflusst. Gessner et al. konnten einen Zusammenhang des EBC-Volumens sowohl mit der FEV₁ als auch mit der forcierten Vitalkapazität (FVC) in gesunden Probanden und COPD-Patienten ausschließen (Gessner et al., 2001).

Nasenklammer

Es wird empfohlen, während der Untersuchung eine Nasenklammer zu tragen. So kann ein Verlust von Probenmaterial über die Nase vermieden werden. Außerdem wird die Wahrscheinlichkeit, dass Partikel aus dem Nasopharynx in die EBC-Probe gelangen, minimiert.

Lagerung

Die Proben sollten, wenn sie nicht direkt weiterverarbeitet werden, nach der Untersuchung eingefroren werden. Auch bei direktem Einfrieren und stabilen Lagerungsbedingungen werden manche Mediatoren und EBC-Bestandteile instabil. H₂O₂ zum Beispiel zeigt schon nach einigen Tagen Konzentrationsschwankungen im EBC. Der pH-Wert dagegen ist auch bei einer Lagerung von bis zu zwei Jahren im EBC konstant.

Alter und Geschlecht

Es sind wenige Daten zum Einfluss von Alter und Geschlecht auf Marker im EBC bekannt. Nur in Bezug auf H₂O₂ ist bekannt, dass dieser Marker bei Kindern nicht altersabhängig ist. Jedoch zeigten sich bei älteren Erwachsenen höhere Werte als bei jungen Erwachsenen (Jobsis et al., 1998; Nowak et al., 2001; van Beurden et al., 2002). EBC kann schon von Kindern im Alter von drei bis vier Jahren gewonnen werden.

Auch bei Säuglingen gelang die Gewinnung von Exhalat ((Cheah et al., 2003; Jobsis et al., 1998).

Nahrungsmittel und Zigarettenkonsum

Weitere Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung von EBC sind Essen und Getränke sowie das Zigarettenrauchen. Obwohl es kaum Daten zum Einfluss von bestimmten Getränken und Lebensmitteln auf EBC-Marker gibt, wird im Rahmen der ATS/ERS Leitlinie (Horvath et al., 2005) empfohlen, einige Stunden vor der Messung keine großen Mahlzeiten zu sich zu nehmen und besonders auf koffeinierte Getränke wie Cola oder Kaffee zu verzichten. In Bezug auf Zigarettenrauchen liegen unterschiedliche Daten vor. Es ist bekannt, dass das Rauchen von Zigaretten einen Anstieg von H_2O_2 , 8-Isoprostan, Nitrotyrosin und der chemotaktischen Aktivität von neutrophilen Granulozyten verursacht. Die Konzentrationen von Interleukin-1 β oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) werden nicht beeinflusst (Balint et al., 2001; Garey et al., 2004; Guatura et al., 2000; Montuschi et al., 2000; Nowak et al., 1996). Aber auch der pH Wert in EBC scheint durch Zigarettenrauch beeinflussbar zu sein. Hier muß zwischen akutem und chronischem Rauchen unterschieden werden (Koczulla et al., 2010).

1.2.5 Reproduzierbarkeit

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Methode sind aus der Literatur unterschiedliche Daten bekannt. Eine gute Vergleichbarkeit wird für den pH-Wert, Adenosin, Aldehyd, Glutathion, 8-Isoprostan, Leukotriene und Prostaglandin-E2 (PGE2) berichtet (Corradi et al., 2003a; Corradi et al., 2003b; Gessner et al., 2003; Huszar et al., 2002; Montuschi et al., 2003b; Montuschi et al., 2003c). Eine große Variabilität der Konzentrationen wird dagegen bei den Zytokinen angegeben. Als Grund für diese Schwankungen werden die geringen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen diskutiert, die oft im untersten Messbereich der sich auf dem Markt befindlichen Assays liegen (Bucchioni et al., 2003; Carpagnano et al., 2003; Gessner et al., 2003; Scheideler et al., 1993; Shahid et al., 2002).

1.2.6 Marker der Inflammation und Mikroorganismen in exhaliertem Atemwegskondensat

Bisher wurde eine Vielzahl von Substanzen im EBC nachgewiesen und untersucht.

Die meisten Daten gibt es zu Inflammationsmarkern und zu oxidativem Stress, im besonderen H_2O_2 , NO, Adenosin, Prostanoiden, Leukotrienen und dem pH-Wert, sowie zu verschiedene Zytokinen. Aber auch der Nachweis verschiedener Bakterien im EBC sind Gegenstand der aktuellen Forschung (Schreiber et al., 2002; Vogelberg et al., 2003).

pH- Wert

Der pH-Wert stellt einen viel verwendeten und gut reproduzierbaren Marker der pulmonalen Inflammation dar. Der pH-Wert wird durch eine Reihe von Puffersystemen in einem bestimmten Bereich stabil gehalten. Die wichtigsten Puffersysteme des EBCs sind das Bikarbonat-Puffersystem und das Ammoniak-Puffersystem (Hunt et al., 2000; Hunt et al., 2002).

Der unmittelbar nach der Atemkondensatgewinnung gemessene pH-Wert im EBC zeigt Schwankungen, die dem Gehalt an Kohlendioxid (CO_2) in der Probe zugrunde liegen. Zur Verbesserung der Stabilität des pH-Wertes kann eine Deaeration durchgeführt werden. Dabei wird ein CO_2 -freies Gas, wie z. B. Argon, durch die Probe geleitet (Hunt et al., 2000). Mit Hilfe der Deaeration wurden bei gesunden Probanden pH-Werte von im Mittel 7,7 gemessen. Diese Werte treffen sowohl für oral gemessene als auch für intubierte Patienten zu.

Durch verschiedene Inflammationsreaktionen kann es zu Veränderungen des pH-Werts kommen. Deutlich erniedrigte pH-Werte im EBC konnten bei akutem Asthma (Hunt et al., 2000; Kostikas et al., 2002), zystischer Fibrose (Tate et al., 2002), COPD (Kostikas et al., 2002), Bronchiektasen (Kostikas et al., 2002) und akuter Lungenschädigung (ARDS) (Gessner et al., 2003) gefunden werden. Nach erfolgreicher Therapie mit Steroiden wurde bei Asthma-Patienten ein Wiederanstieg zu normalen pH-Werten beobachtet (Hunt et al., 2000). Außerdem konnte eine Korrelation zwischen pH-Werten und Entzündungsreaktionen in der Lunge, die mit dem Anstieg von eosinophilen oder neutrophilen Granulozyten einher ging, hergestellt werden (Kostikas et al., 2002).

Die Variabilität der pH-Werte im EBC bei gesunden Probanden innerhalb eines Tages bzw. innerhalb einer Woche bewegt sich zwischen 3,5 und 4,5 %. Vaughan et al. konnten zeigen, dass der pH-Wert von deaeriertem EBC nicht durch Hyperventilation, die Sammelzeit, die Lagerungszeit (bis zu zwei Jahren), eine Sammlung durch den Mund oder endotracheal oder eine akute, durch Methacholin induzierte Atemwegsobstruktion beeinflusst wird (Vaughan et al., 2003).

Es wird diskutiert, inwieweit der oral gewonnene pH-Wert im EBC die tatsächliche Situation in den unteren Atemwegen widerspiegelt, da im Mund hohe Ammoniak-Konzentrationen existieren und Ammoniak zu den wichtigsten Puffern gehört. Dies konnte jedoch auch durch ausgedehnte Studien bisher nicht vollends geklärt werden (Effros, 2001;Effros, 2003;Effros, 2004a;Effros, 2004b;Hunt et al., 2000;Hunt et al., 2002;Vaughan et al., 2003).

Die Messung des pH-Werts kann durch Blutgasautomaten oder durch Glaselektroden erfolgen. Ein Nachteil der Blutgasautomaten besteht darin, dass diese Geräte in der Regel nicht für eine Messung in Wasser geeicht sind, weswegen einige Arbeitsgruppen den Gebrauch einer Glaselektrode vorziehen.

Interleukin-8

Bisher existieren nicht viele Arbeiten zum Nachweis von Interleukin-8 (IL-8) im EBC. Oft scheitert der Nachweis von Zytokinen an der Sensitivitätsgrenze der üblichen Assays. Sack et al. gelang der Nachweis von IL-8 mittels eines Multiplex Assays (Sack et al., 2006). Dagegen beschrieben Bayley et al. den Nachweis von IL-8 im EBC mittels eines kommerziell erwerblichen ELISAs als ungenügend (Bayley et al., 2008). Gessner et al. fanden eine Korrelation von im EBC erhöhten IL-8-Werten mit einer an dem pH-Wert im EBC gemessenen lokalen Entzündung bei Patienten mit akuter Lungenschädigung (Gessner et al., 2003).

Proteine

Im EBC können ebenfalls Proteine gemessen werden. Zumeist sind die Messmethoden jedoch nicht sensitiv genug, um die Proteine quantitativ zu detektieren (Horvath et al., 2005). Es ist jedoch bekannt, dass unterschiedliche Messtemperaturen verschiedene

Auswirkungen auf die Proteinsammelmenge haben (Soyer et al., 2006). Bei konstant niedrigen Sammeltemperaturen scheint die Proteinkonzentration im EBC höher zu sein.

Die folgende Tabelle soll einen Überblick über Proteine und weitere Bestandteile geben, die bisher in EBC gemessen werden konnten.

Leukotriene	40 – 12000 pg/ml
PGE2	- 400 pg/ml
Thromboxan B2	0,7 – 12,2 pg/ml
IL-1 β	- 370 pg/ml
IL-8	- 900 pg/ml
IL-6	- 4,7 pg/ml
sIL-2R	- 2000 pg/ml
TNF- α	- 120 pg/ml
Hydrogenperoxid	- 2 μ M
DNS	- 40 ng/ml
ECP, EPX	- 80 ng/ml
Cu/Zn SOD	- 5000 pg/ml
Isoprostane	- 250 pg/ml
TBARs	- 0,1 nM
Chlorid	0,2 – 14 μ g/ml
Urea	< 10 μ g/ml
Nitrite/Nitrate	< 0,1 – 26,5 μ mol/l
D-Dimere	
Stress-Proteine (HSP)	
Tumor-Marker (CEA, SCC, CYFRA, TPA-M)	
Noradrenalin, Laktat, Serotonin	
Nitrotyrosin, Tyrosin	

Tab. 3: Bestandteile in EBC. Modifiziert nach G. Becher, FILT GmbH.

Bisher gibt es allerdings nur eine Arbeit, die AAT in der Ausatemluft nachweisen konnte. Hier war es nur in einem geringen Prozentsatz (19,6 %) möglich, AAT verlässlich im EBC zu quantifizieren (Bayley et al., 2008).

2 Fragestellung

Bislang wurde mittels Bronchoskopie oder Sputuminduktion Material gewonnen, in dem Alpha-1-Antitrypsin (AAT) bestimmt wurde. Der invasive bzw. semiinvasive Ansatz beider Methoden birgt allerdings Nachteile. Mittels einer AAT-Bestimmung im EBC würde sich ein nichtinvasiver, einfacher Zugangsweg zur Lunge eröffnen. Bislang waren die Methoden des AAT-Nachweises im EBC nicht sensitiv genug, reproduzierbar AAT in der Lunge zu detektieren.

Ziel der Studie ist es:

1. zu zeigen, dass AAT mit der Methode des exhalieren Atemwegskondensats nicht invasiv im EBC gemessen werden kann. Es soll im Rahmen dieses Projekts sowohl ein AAT-ELISA als auch ein AAT-Western Blot etabliert werden.
2. zu untersuchen, ob AAT im EBC von Patienten mit AAT-Mangel nachgewiesen werden kann.
3. zu untersuchen, ob es eine Korrelation der gemessenen AAT-Werte im EBC zu den AAT-Werten im Serum gibt.
4. AAT-Konzentrationen im EBC von gesunden Kontrollpersonen mit den AAT-Konzentrationen von Patienten mit stabiler COPD, Patienten mit exazerbierter COPD sowie substituierten und nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel zu vergleichen.
5. das Verhalten von pH-Wert und Interleukin-8 (IL-8) als Marker der Inflammation im EBC von Patienten mit COPD, exazerbierter COPD, substituierten und nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel und von Gesunden zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden, Ein-/Ausschlußkriterien

		HC	COPD	COPD exazerbiert	AAT substituiert	AAT nicht substituiert	ANOVA
Alter (Jahre)		36,1(±11,53)	67,9(±8,10)	69,4(±11,60)	55,0(±9,11)	42,0(±7,07)	p < 0,0001
Geschlecht (m/w)		6/4	9/1	8/2	8/2	2/0	
Zigarettenpackungsjahre (py)		4(±7,38)	31,1(±16,26)	47,4(±28,91)	26,2(±23,87)	7,5(±3,53)	p = 0,0007
Zahl der Raucher zum Zeitpunkt der Messung		0	3	1	0	0	
Vor Broncholyse	FEV1/VC	103,2(±6,73)	60,23(±18,66)	54,55(±11,90)	51,27(±12,93)	81,60(±28,70)	p < 0,0001
	FEV1	106,8(±11,49)	55,35(±12,51)	35,29(±12,75)	47,88(±17,46)	106,95(±37,68)	p < 0,0001
Nach Broncholyse	FEV1/VC		64,25(±22,28)	83,2(±68,26)		57,9	p = 0,419 *)
	FEV1		58,85(±14,63)	47,05(±6,65)		76,9	p = 0,154 *)

Tab. 4 : Patientencharakteristik (m = männlich, w = weiblich, HC = gesunde Kontrollen, AAT = Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin Mangel). *): Vergleich der Gruppen nach Broncholyse mit t-Test.

In die Studie wurden als Probanden zehn gesunde Personen, zehn Patienten mit stabiler COPD, zehn Patienten mit exazerbierter COPD, zehn substituierte Patienten mit AAT-Mangel und zwei nicht substituierte Patienten mit AAT-Mangel eingeschlossen.

Die Gruppe der gesunden Probanden wurde aus dem Laborpersonal rekrutiert, wobei das mittlere Lebensalter 36 Jahre betrug.

Die Patienten mit einer stabilen COPD waren im Mittel 67,9 (SD ± 8,1) Jahre alt und wurden entsprechend der GOLD Klassifikation den Stadien GOLD 2 und GOLD 3 zugeordnet. Eine Exazerbation (Franciosi et al., 2006) oder die Einnahme von Steroiden wurde per Fragebogen ausgeschlossen. Die Exazerbation wurde nach den Anthonisen Kriterien (Anthonisen et al., 1987) definiert.

Zusätzlich wurden die Entzündungsparameter Procalcitonin (PCT) und C-reaktives Protein (CRP) bestimmt und ein Differenzialblutbild angefertigt, um systemische Zeichen einer Inflammation auszuschließen. In der Gruppe der Patienten mit COPD befanden sich zum Zeitpunkt der Erhebung der Daten drei aktive Raucher und sieben ehemalige Raucher.

Die Patienten mit einer exazerbierten COPD hatten ein mittleres Lebensalter von 69,4 (SD \pm 11,6) Jahren.

Es wurden zehn Patienten mit homozygotem AAT-Mangel (PiZZ) eingeschlossen. Diese Patienten unterzogen sich einmal pro Woche entsprechend der Leitlinien der ATS/ERS (2003) einer Substitutionstherapie mit AAT (Prolastin®, Talecris Biotherapeutics, Inc., North Carolina, USA). Dies wurde mit 60 mg/kg Körpergewicht gewichtsadaptiert intravenös zugeführt. Das mittlere Lebensalter der Patienten betrug 55 (SD \pm 9,11) Jahre.

Zusätzlich wurden zwei nicht substituierte Patienten mit homozygotem AAT-Mangel mit einem mittleren Lebensalter von 42 (SD \pm 7,07) Jahren in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten mit AAT-Mangel wurden aus dem deutschen Register für Patienten mit AAT-Mangel rekrutiert. Die nicht substituierten Patienten wurden über unsere Ambulanz diagnostiziert und vor Beginn der Substitutionstherapie gemessen und eingeschlossen.

Die Zahl der nicht substituierten Patienten ist deutschlandweit gering, deshalb ist die Zahl der eingeschlossenen Patienten sehr niedrig.

Zudem wurden vereinzelt Patienten mit einem heterozygoten AAT-Mangel mit einem mittleren Alter von 34 Jahren gemessen. Diese Patienten wurden zufällig über unsere Ambulanz diagnostiziert und außerhalb des fest eingeschlossenen Patientenkollektivs mitgemessen.

Alle Patienten erhielten eine Lungenfunktionsuntersuchung und füllten einen nach dem St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ) (Jones et al., 1991) modifizierten Fragebogen aus (s. Anhang). Sie wurden über den genauen Ablauf der Studie mittels eines Aufklärungsbogens informiert.

Die Studie lag der Ethikkommission Marburg vor und wurde mit einem positiven Votum versehen (Nr. 59/06). Alle Studienteilnehmer gaben ihr schriftliches Einverständnis.

3.2 Untersuchungsablauf

Von gesunden Probanden, Patienten mit stabiler COPD, Patienten mit exazerbierter COPD und nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel wurde einmalig EBC mit Hilfe des RTubes™ (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, USA) gewonnen. Danach wurden eine Blutentnahme und eine Lungenfunktionsuntersuchung (Jaeger Cardinal Healthcare, Hoechheim, Deutschland) durchgeführt.

Substituierte Patienten mit AAT-Mangel hatten am ersten, dritten und sechsten Tag nach ihrer wöchentlichen Substitution mit AAT einen Studienbesuch. An allen Tagen wurde EBC gewonnen und eine Blutentnahme (Differentialblutbild, AAT, CRP, PCT) durchgeführt. Am ersten Tag wurde zusätzlich eine Lungenfunktionsuntersuchung durchgeführt.

3.3 Gewinnung von exhaliertem Atemwegskondensat

Exhalierendes Atemwegskondensat wurde mit einem RTube™ gewonnen. Dabei atmeten die Probanden für zehn Minuten über ein Mundstück mit einer Einwegklappe in ein auf -20 °C gekühltes Aluminiumrohr, in das ein Sammelrohr eingeführt war. Die Außenseite des Aluminiumrohres war mit einem Schaumstoffmantel verkleidet, um den Probanden ein problemloses Halten des gekühlten Gerätes zu ermöglichen.

Die Probanden trugen eine Nasenklammer und wurden dazu angehalten, ruhig und regelmäßig zu atmen. Bei dem Bedürfnis zu Schlucken oder zu Husten wurden sie angewiesen, das Gerät vom Mund zu nehmen (Horvath et al., 2005).

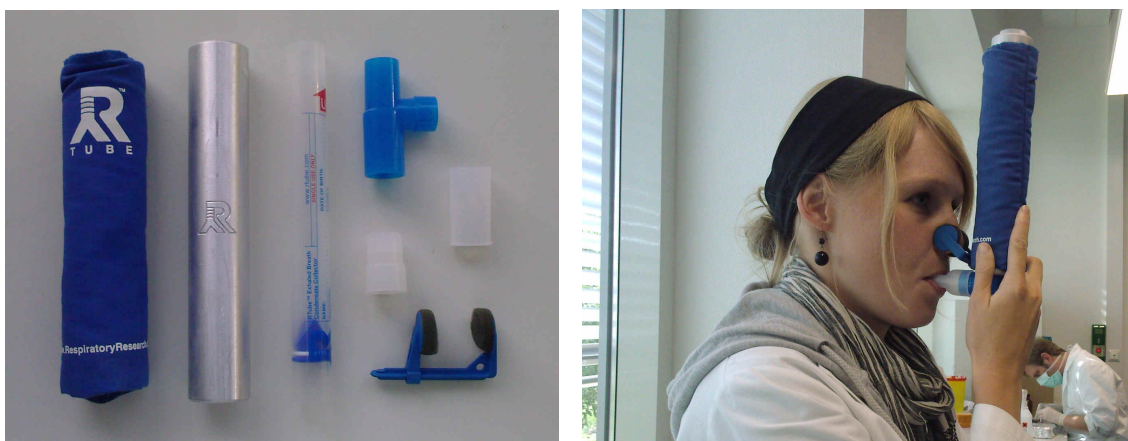


Abb. 5:Das RTube™.

Anschließend wurde das EBC mit Hilfe eines Zylinders (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, USA) an der Spitze des Sammelrohrs gesammelt und mit einer Pipette (Labsystems, Quickborn, Deutschland) in ein Eppendorfreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt.

Das EBC wurde entweder direkt zur pH-Wert-Bestimmung verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Sammelrohr, Eppendorfreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch mit destilliertem Wasser gewaschen, um herstellungsbedingte Rückstände zu beseitigen, über Nacht getrocknet und mit UV-Licht bestrahlt, um eine eventuelle Kontamination zu verhindern.

3.4 pH-Wert-Bestimmung in exhalierem Atemwegskondensat

250 µl EBC wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur (23 °C) für 20 min mit einem inerten Gas (Argon) durchflutet, um CO₂ zu eliminieren. Das Gas wurde über eine Glaspipette (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland) in das EBC geleitet.

Anschließend wurde der pH-Wert mit einer Glaselektrode (Mettler Toledo, Greifensee Schweiz) und einem pH-Meter (Windaus, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland) bestimmt.

Vor jeder Messung wurde eine Zweipunktkalibrierung (pH 4, 7, 9) durchgeführt.

3.5 Western Blot Analyse

Zum Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in EBC wurde ein AAT-Western Blot etabliert.

Jeweils 1 ml EBC wurde in einer Vakuumzentrifuge (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) konzentriert und über Nacht bei 4 °C mit 24 µl 1 M Tris pH 7 resuspendiert. Die Proben wurden für 1 min bei 95 °C in 4 µl Roti-Load 1 4-fach (Roth, Karlsruhe, Deutschland) erhitzt. Sie wurden auf einem 10-20 % Tris Tricin Gel (anamed, Darmstadt, Germany) getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran 0,45 µM (BioRAD, München, Deutschland) übertragen. Daraufhin wurde die Membran 2 h mit 5 % fettarmem Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in PBS blockiert.

Anschließend wurde die Membran für 12 h über Nacht bei 4 °C mit primärem Kaninchen-Antikörper gegen humanes Alpha-1-Antitrypsin (Anti-human α -1-Antitrypsin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 5 % Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen wurde ein Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Pierce, Bonn, Deutschland), welcher mit Meerrettichperoxidase markiert war, zugegeben. Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 verwendet. Die Membran wurde für 2 min mit einem Chemilumineszenz Kit (Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert und auf einem Röntgenfilm (Kodak, Rochester, USA) mit Entwickler (Curix 60, AGFA, Köln, Deutschland) visualisiert.

Als Positivkontrolle wurde humanes Alpha-1-Antitrypsin (calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland) in PBS mit einer Konzentration von 0,0625 ng/ml und 0,125 ng/ml verwendet.

3.6 Alpha-1-Antitrypsin-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Durch vorherige Gesamtproteinbestimmung in EBC und die Durchführung von Western Blots mit EBC wurde deutlich, dass die Detektionsbereiche schon existierender ELISAs nicht ausreichen, um geringste Mengen von Alpha-1-Antitrypsin in EBC nachzuweisen. Für die Messung der Konzentrationen von Alpha-1-Antitrypsin in EBC wurde deshalb ein sensitiverer AAT-ELISA entwickelt und etabliert.

Der ELISA erforderte eine Bearbeitungszeit von zwei Tagen.

1. Tag

Jeweils 1 ml EBC wurde über Nacht in einer Vakuumzentrifuge (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) konzentriert und 3 h vor dem Auftragen der Proben mit 100 μ l/well 0,1 % Tween in PBS bei Raumtemperatur resuspendiert. Eine 96-Well-Platte (F96 Maxi Sorp Immuno-Platten, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurde 12 h über Nacht bei 4 °C mit primärem Kaninchen-Antikörper gegen humanes Alpha-1-Antitrypsin (Anti-human α -1-

Antitrypsin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Beschichtungspuffer (0,05 M Natriumcarbonat, pH 9,6) im Verhältnis 1:200 inkubiert.

2. Tag

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,1% Tween 20 in PBS) wurde die Multiwellplatte mit 300 µl/well Blocking Reagent Gelatine Hydrolysat (0,1 % Gelatine in PBS) in destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 (d.h. 3 ml Blocking Reagent wurden auf 30 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt) für 2 h bei 37 °C im Inkubator (Minitron, InforsHT, Einsbach, Deutschland) blockiert. Danach erfolgten erneut drei Waschvorgänge. Anschließend wurden 100 µl/well EBC-Proben und eine Verdünnungsreihe mit einem Standard aus humanem Alpha-1-Antitrypsin (calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland) aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (Typ ST5, Ingenieurbüro CAT, M.Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) inkubiert. Für die Verdünnungsreihe wurden auf der Multiwellplatte in die wells C1 und C2 bis H1 und H2 und in A1 und A2 jeweils 100 µl/well Tween-Diluent [0,5 g bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 50 ml 0,1 % Tween 20 in PBS] vorgelegt. In B1 und B2 wurden 200 µl/well Standard in Tween-Diluent im Verhältnis 1:200 000 gegeben. Es wurde eine Standardreihe mit abfallender Konzentration im Bereich 5000 bis 78,125 pg/ml hergestellt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Anschließend wurde die Multiwellplatte drei weitere Male gewaschen und mit einem aus der Ziege gewonnenen und mit Meerrettichperoxidase markierten sekundären Antikörper gegen humanes Alpha-1-Antitrypsin (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, Texas, USA) in Diluent [1 g bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 100 ml PBS] im Verhältnis 1:2000 bei Raumtemperatur (RT) für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Menge des gebundenen Antikörpers wurde nach dreimaligem Waschen mit der indirekten Peroxidase-Methode verifiziert. Dazu wurde als Substrat 100 µl/well TMB (Tetramethylbenzidine, calbiochem, Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland) zugegeben, bei Dunkelheit auf dem Schüttler für 15 min inkubiert und anschließend mit 100 µl/well 3 N H₂SO₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entwickelt. Die Absorption wurde mit einem Tecan Ultra 384 Reader (Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

3.7 Interleukin-8-ELISA

Der Interleukin-8 (IL-8) ELISA wurde von der Firma FILT (FILT Lungen- und Thoraxdiagnostik GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 250 µl EBC jeder Probe aliquotiert und auf Trockeneis verschickt. Die Proben wurden mittels einer Schlüsselliste verblindet. Die entblindeten Proben wurden entsprechend der statistischen Angaben (s.u.) ausgewertet.

3.8 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mittels des T-Tests (zweiseitig) oder mittels ANOVA bei Untersuchungen mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. Post hoc-Tests wurden mittels T-Test (zweiseitig) mit Bon-Ferroni Anpassung durchgeführt. Ergebnisse für $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in exhaliertem Atemwegskondensat

Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dem Nachweis verschiedener Mediatoren in Exhaliertem Atemwegskondensat (EBC). Die niedrigen Konzentrationen von AAT im Atemwegskondensat stellen eine hohe Herausforderung für eine sichere Analyse dar. Bisher gibt es keine sensitive und reproduzierbare Methode, um Alpha-1-Antitrypsin (AAT) in EBC nachzuweisen.

4.1.1 Alpha-1-Antitrypsin ist im Western Blot nachweisbar

Zum Nachweis von AAT in EBC sollte sowohl ein AAT-Western-Blot als auch ein AAT-ELISA etabliert werden. Es ist gelungen, einen Western Blot zu entwickeln, der AAT standardisiert und reproduzierbar in EBC detektiert. Wiederholt konnte AAT im EBC von Patienten aller untersuchten Gruppen dargestellt werden (Abb. 6). In dem gezeigten Blot stellt die erste Bande den AAT-Gehalt im EBC eines Gesunden dar, die zweite Bande zeigt den AAT-Gehalt im EBC eines homozygoten, nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel, die dritte Bande den AAT-Gehalt in einem heterozygoten, nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel und die vierte Bande den AAT-Gehalt in einem homozygoten substituierten AAT-Mangel-Patienten. In der optischen Auswertung zeigt sich, dass die größte Menge AAT bei dem heterozygoten, nicht substituierten Patienten nachweisbar ist.

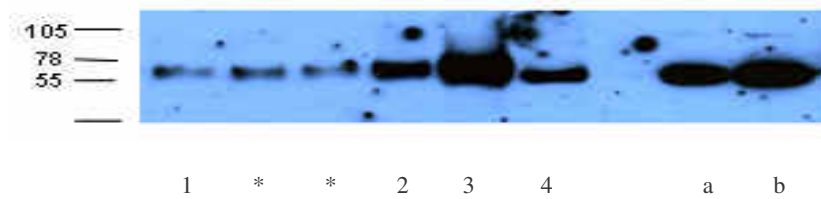


Abb. 6: Nachweis von AAT in EBC im Western Blot. Der gezeigte Blot detektiert AAT im EBC von Gesunden (1), homozygoten nicht substituierten AAT-Patienten (2), heterozygoten nicht substituierten AAT-Patienten (3) und homozygoten substituierten AAT-Patienten (4) auf der Höhe von 55 kDa. Als Positivkontrolle wurde humanes AAT in den Konzentrationen 0,0625 ng/ml (a) und 0,125 ng/ml (b) verwendet. Während der Entwicklung des AAT-Western Blots wurden auch Raucher gemessen. Die Ergebnisse werden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert (*).

4.1.2 Alpha-1-Antitrypsin ist im ELISA nachweisbar

Es wurde ein Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von AAT in EBC validiert und standardisiert.

Ein sicherer und reproduzierbarer Nachweis von AAT-Konzentrationen bis in den Bereich von 0,2 ng/ml war möglich.

Es wurden die EBC-Proben von Gesunden, COPD Patienten, Patienten mit exazerbierter COPD, substituierten AAT-Patienten und nicht substituierten AAT-Patienten auf den Gehalt von AAT untersucht. In allen Gruppen konnte AAT im EBC sicher nachgewiesen werden (siehe unten). Abbildung 7 zeigt beispielhaft den Vergleich der AAT-Konzentration im EBC von Gesunden (HC) (n=9) und von AAT-Patienten am Tag 6 nach Substitution (n=9). Die mittlere AAT-Konzentration bei den Gesunden betrug 251,3 pg/ml (SD=14,90) und bei den AAT-Patienten am Tag 6 nach Substitution 340,8 pg/ml (SD=33,16). Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,0256$) (Abb. 7).

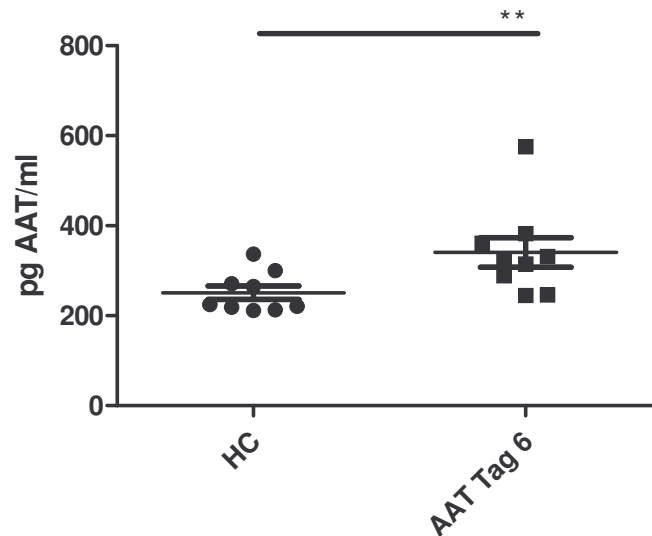


Abb. 7: Nachweis von AAT im EBC mittels ELISA. Der Detektionsbereich schließt 0,2 ng/ml ein. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit ** markiert.

4.2 Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin im Exhalat von Patienten mit Alpha-1-Antitrypsin-Mangel

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob AAT im EBC von Patienten mit AAT-Mangel nachgewiesen werden kann. AAT im EBC von AAT-Patienten konnte sowohl mit dem oben beschriebenen Western Blot als auch mit dem entwickelten ELISA detektiert und dargestellt werden.

AAT konnte im EBC von Patienten mit AAT-Mangel an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution mit humanem AAT im Western Blot detektiert werden. Bei der visuellen Auswertung des Western Blots zeigt die erste Spur den AAT-Gehalt im EBC eines Gesunden, die zweite, dritte und vierte Spur den AAT-Gehalt im EBC eines Patienten mit AAT-Mangel an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution. Spur 5 zeigt den AAT-Gehalt im EBC eines heterozygoten AAT-Patienten und Spur 6 den AAT-Gehalt eines COPD-Patienten (Abb. 8). Die Proben der Patienten mit AAT-Mangel zeigten stärkere Banden als die Proben von Gesunden oder COPD-Patienten. Es erfolgte jedoch keine quantitative Auswertung der durchgeführten Blots.

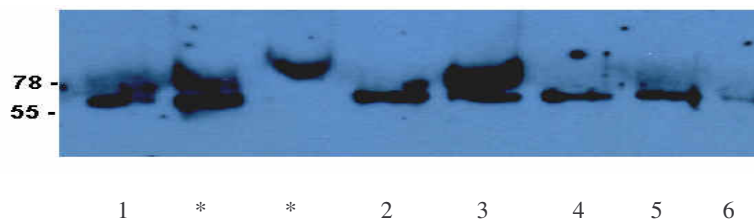


Abb. 8: Vergleich der EBC-AAT-Konzentrationen im Western Blot. Humanes AAT konnte in Gesunden (1), in homozygoten AAT-Patienten an Tag 1 (2), Tag 3 (3) und Tag 6 (4) nach Substitution, in heterozygoten AAT-Patienten (MZ) (5) und in COPD-Patienten (6) detektiert werden. In diesem Blot wurde auch das EBC von Rauchern untersucht. Die Ergebnisse werden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert (*).

Es gelang ebenfalls der Nachweis von AAT in Patienten mit AAT-Mangel mittels ELISA. AAT konnte im EBC aller untersuchten Patienten an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution gemessen werden. Die mittlere Konzentration von AAT an Tag 1 betrug 832,0 pg/ml (SD=460,9), an Tag 3 388,8 pg/ml (SD=169) und an Tag 6 340,8 pg/ml (SD=33,16). Der Unterschied war nicht signifikant (Abb.9).

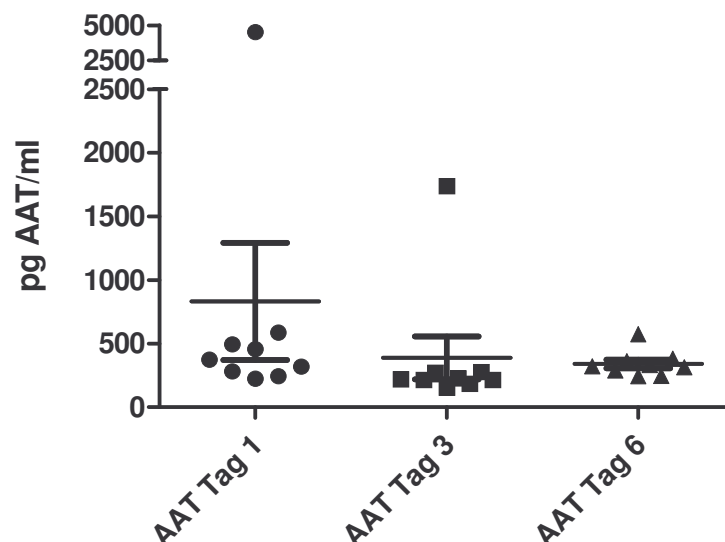


Abb. 9: AAT-Konzentration im ELISA bei AAT-Patienten an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution. Im Verlauf einer Woche nach Substitution war bei Patienten mit AAT-Mangel (n=9) kein signifikanter Unterschied der AAT-Konzentrationen erkennbar.

4.3 Alpha-1-Antitrypsin-Werte im exhalierten Atemwegskondensat korrelieren nicht mit Alpha-1-Antitrypsin-Werten im Serum

Patienten mit einem sowohl hetero- als auch homozygoten AAT-Mangel haben verminderte AAT-Serumwerte. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation der gemessenen AAT-Werte im EBC zu den AAT-Werten im Serum gibt.

Der unten stehende Western Blot zeigt den Vergleich eines Gesunden mit einem nicht substituierten Patienten mit homozygotem AAT-Mangel. Der gesunde Proband hatte eine im Serum gemessene AAT-Konzentration von 1,83 g/l, der nicht substituierte Patient mit AAT-Mangel zeigte eine AAT-Konzentration von 0,28 g/l. Im Western Blot hingegen zeigte der Patient mit AAT-Mangel eine deutlich stärkere Bande als der Gesunde. Die von den Patienten im Serum bestimmten AAT-Werte ließen sich nicht mit den im Western Blot detektierten AAT-Konzentrationen korrelieren (Abb. 10).

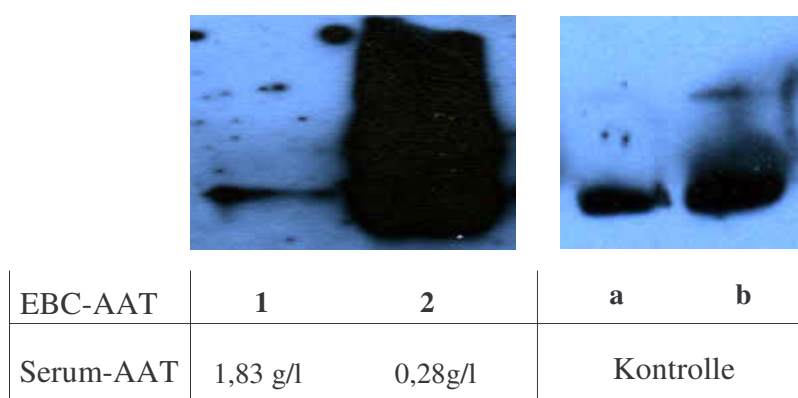


Abb. 10: Vergleich eines Gesunden mit einem nicht substituierten AAT-Patienten im Western Blot.

Der nicht substituierte AAT-Patient (2) hatte im Western Blot eine wesentlich stärkere Bande als der Gesunde (1). Diese Beobachtung korrelierte nicht mit den gemessenen AAT-Serumwerten. Als Kontrolle wurde humanes AAT in den Konzentrationen 0,0625 ng/ml (a) und 0,125 ng/ml (b) verwendet.

4.4 Vergleich der Alpha-1-Antitrypsin-Werte im exhaliierten Atemwegskondensat der verschiedenen Patientengruppen

AAT gilt als „Akute-Phase-Protein“ und wird als Inflammationsmarker angesehen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die AAT-Konzentrationen im EBC von gesunden Kontrollpersonen mit den gemessenen Konzentrationen in den anderen Patientengruppen verglichen werden.

Wir verglichen die gesunde Kontrollgruppe mit Patienten mit stabiler und mit exazerbierter COPD im ELISA. Für die Gruppe der Gesunden ($n = 9$) fand sich eine mittlere AAT-Konzentration von 251,3 pg/ml (SD=14,90), für die Patienten mit stabiler COPD ($n = 9$) eine mittlere AAT-Konzentration von 246,9 pg/ml (SD=23,73) und für die Patienten mit exazerbierter COPD ($n = 9$) eine mittlere AAT-Konzentration von 586,2 pg/ml (SD=109,3). Es zeigte sich, dass sich die AAT-Konzentrationen von Gesunden und Patienten mit einer stabilen COPD nicht unterschieden. Patienten mit einer exazerbierten COPD dagegen hatten signifikant höhere AAT-Werte als Gesunde ($p=0,0105$) und Patienten mit einer stabilen COPD ($p=0,0103$) (Abb. 11).

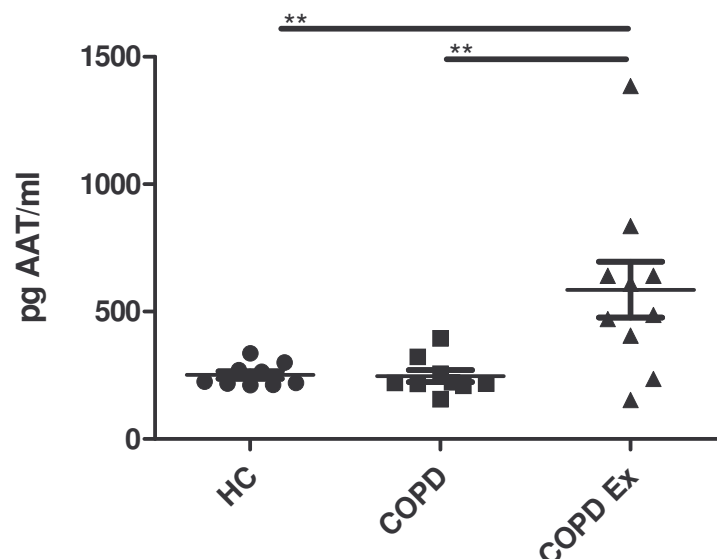


Abb. 11: Vergleich der AAT-Konzentrationen von Gesunden, Patienten mit stabiler COPD und Patienten mit exazerbierter COPD im ELISA. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit ** gekennzeichnet.

Wir verglichen ebenfalls die AAT-Konzentrationen von Gesunden und von Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu Patienten mit AAT-Mangel an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution ($n = 9$). Die mittlere AAT-Konzentration in der gesunden Kontrollgruppe betrug 251,3 pg/ml ($SD=14,90$) und in der COPD-Gruppe 246,9 pg/ml ($SD=23,73$) gegenüber einer mittleren AAT-Konzentration von 832,0 pg/ml ($SD=460,9$) an Tag 1, 388,8 pg/ml ($SD=169$) an Tag 3 und 340,8 pg/ml ($SD= 33,16$) an Tag 6 nach Substitution in der Gruppe der AAT-Patienten. Der Unterschied der AAT-Werte der Patienten mit AAT-Mangel an Tag 6 nach Substitution war sowohl gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,0256$) als auch gegenüber den COPD-Patienten ($p=0,035$) signifikant (Abb. 12).

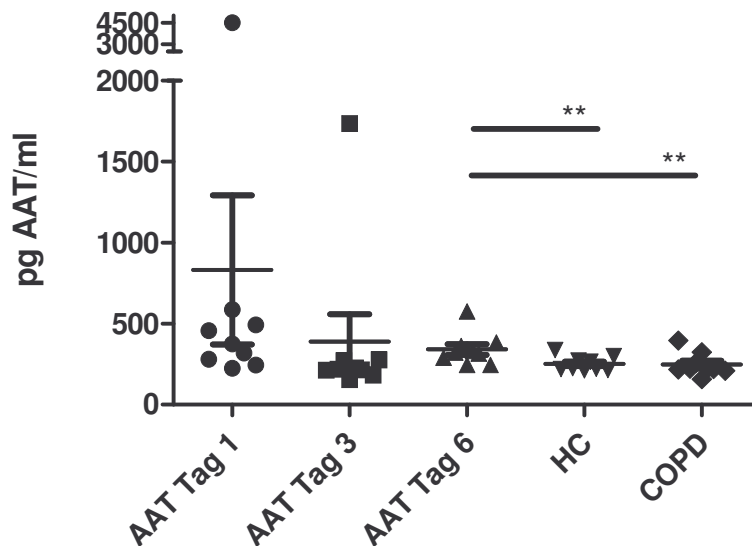


Abb. 12: Vergleich der AAT-Konzentrationen von Gesunden, COPD-Patienten und substituierten AAT-Patienten im ELISA. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit ** gekennzeichnet.

Schließlich wurden die AAT-Konzentrationen von substituierten und nicht-substituierten AAT-Mangel-Patienten verglichen. Die nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel ($n= 2$) zeigten eine mittlere Konzentration von 891,2 pg/ml AAT im EBC ($SD=32,34$), wohingegen substituierte Patienten mit AAT-Mangel zum Beispiel an Tag 6 nach Substitution eine mittlere Konzentration von 340,8 pg/ml ($SD=33,16$) zeigten.

Der Vergleich zeigte, dass AAT-Patienten, die nicht substituiert wurden, eine signifikant höhere Konzentration an AAT aufwiesen als substituierte AAT-Patienten ($p < 0,0001$) (Abb. 13).

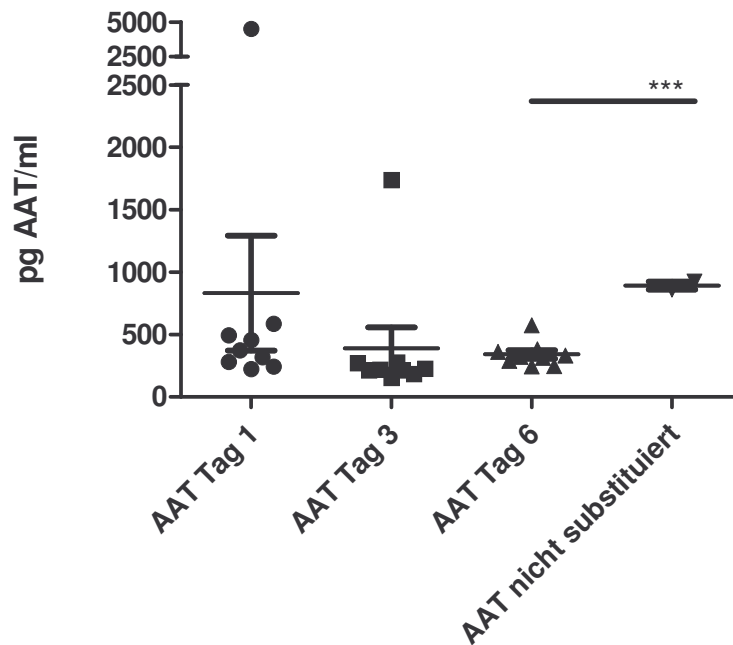


Abb. 13: Vergleich der AAT-Konzentrationen von substituierten und nicht-substituierten Patienten mit AAT-Mangel im ELISA. Hoch signifikante Unterschiede mit $p < 0.005$ sind mit * gekennzeichnet.**

4.5 Korrelation von Alpha-1-Antitrypsin-Werten mit Markern der pulmonalen Inflammation

Um die gemessenen AAT-Werte mit Markern der pulmonalen Inflammation zu vergleichen, wurden in jeder Gruppe die pH-Werte und die IL-8-Werte bestimmt.

4.5.1 COPD-Patienten und Patienten mit einer exazerbierten COPD haben signifikant niedrigere pH-Werte im exhaliierten Atemwegskondensat als Gesunde

Der mittlere pH-Wert in der gesunden Kontrollgruppe betrug 8,18 (SD=0,059). Die pH-Werte in der COPD-Gruppe lagen dagegen bei 7,294 (SD=0,246) und bei den Patienten mit einer exazerbierten COPD bei 6,837 (SD=0,425). Im Vergleich zeigte sich, dass die pH-Werte in der Gruppe der Patienten mit einer stabilen COPD sowie in der Gruppe der Patienten mit einer exazerbierten COPD signifikant niedriger waren als in der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,0025$; $p=0,0057$) (Abb. 15).

Die pH-Werte der AAT-Patienten nach Substitution waren ebenfalls niedriger als die pH-Werte der gesunden Kontrollgruppe. Der mittlere pH-Wert an Tag 1 nach Substitution betrug 7,84 (SD=0,296) an Tag 3 7,47 (SD=0,404) und an Tag 6 7,71 (SD=0,282). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Der Unterschied der pH-Werte der nicht-substituierten Patienten mit AAT-Mangel war ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Hier betrug der mittlere pH-Wert 7,99 (SD=0,125) (Abb. 15).

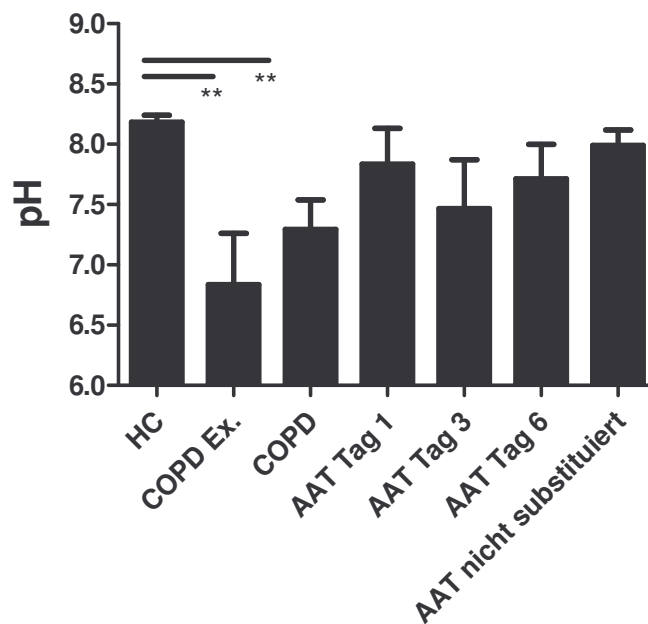


Abb. 15: Die pH-Werte von Patienten mit COPD und exazerbierter COPD sind signifikant niedriger als in Gesunden (HC). Die Grafik zeigt den Vergleich der pH-Werte aller untersuchten Gruppen. Signifikante Unterschiede zu der gesunden Kontrollgruppe von $p < 0,05$ sind mit ** markiert.

4.5.2 Die Interleukin-8-Werte bei Alpha-1-Antitrypsin-Patienten sind signifikant höher als bei COPD-Patienten und Gesunden

Als weiterer Inflamationsmarker wurde Interleukin-8 (IL-8) mittels ELISA bestimmt. Die mittlere IL-8-Konzentration im EBC betrug bei den AAT-Patienten 0,1071 pg/ml (SD=0,01) am Tag 1, 0,1158 pg/ml (SD=0,016) an Tag 3 und 0,1011 pg/ml (SD=0,008) an Tag 6 gegenüber einer mittleren IL-8-Konzentration von 0,0662 pg/ml (SD=0,002) in der COPD-Gruppe und 0,0585 pg/ml (SD=0,015) bei den Gesunden (Abb. 16). Der Unterschied der gemessenen IL-8-Werte in den Patienten mit AAT-Mangel an Tag 1, 3 und 6 war sowohl gegenüber den Gesunden ($p=0,0136$; $p=0,0174$; $p=0,0166$) als auch den Patienten mit COPD ($p=0,001$; $p=0,0046$; $p=0,0005$) signifikant. Innerhalb einer Woche nach Substitution konnten bei den AAT-Patienten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

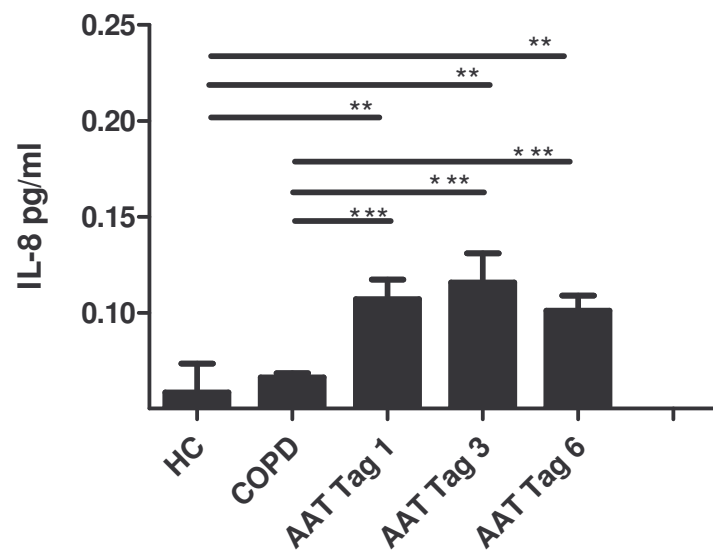


Abb. 16: IL-8-Elisa von AAT-Mangel-Patienten im Vergleich zu Gesunden (HC) und Patienten mit COPD. Signifikante Unterschiede von $p < 0,05$ sind mit **, hoch signifikante Unterschiede von $p < 0,005$ mit *** markiert.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis von AAT in EBC mit ELISA und Western Blot etabliert und standardisiert werden. Zusätzlich sollten die AAT-Werte verschiedener Patientengruppen miteinander verglichen und mit Markern pulmonaler Inflammation korreliert werden.

Nachweis von AAT in EBC mittels ELISA und Western Blot

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, AAT in EBC nachzuweisen. Dazu konnte sowohl ein AAT-ELISA als auch ein AAT-Western Blot standardisiert werden. Im Western Blot konnte AAT bis in den Bereich von 0,0125 ng/ml, das heißt 1,5 pg AAT, reproduzierbar dargestellt werden.

Der entwickelte AAT-ELISA ermöglicht den Nachweis von AAT bis zu einer Grenze von 0,2 ng/ml. AAT war in jedem Individuum der untersuchten Patientengruppen und in der gesunden Kontrollgruppe detektierbar. Dies ist die erste Arbeit, in der humanes AAT in EBC bis zu dieser niedrigen Nachweisgrenze sicher detektiert werden konnte.

Bayley et al. untersuchten einen hauseigenen AAT-ELISA und konnten AAT sicher nur bis zu einer Grenze von 2 ng/ml nachweisen (Bayley et al., 2008). Obwohl Aufbau und Durchführung des von Bayley angewendeten AAT-ELISAs dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten AAT-ELISA ähnlich sind, beschreibt er eine schlechte Reproduzierbarkeit. Bayley et al. untersuchten 46 EBC-Proben von gesunden Kontrollpersonen, Patienten mit COPD und von Patienten mit Bronchiektasen. Das Patientenspektrum der vorliegenden Arbeit bestand aus Gesunden, Patienten mit COPD und exazerbierter COPD und aus Patienten mit AAT-Mangel. Damit betrachtet dieses Patientenkollektiv nicht nur ein breiteres Spektrum an Erkrankungen sondern ist mit 60 untersuchten Proben deutlich größer. Nur 19,6 % der von Bayley et al. untersuchten Proben erreichten die untere Quantifikationsgrenze des Assays, in der von uns durchgeführten Arbeit erreichten alle gemessenen Proben die untere Quantifikationsgrenze und es gab keine Ausfälle.

Es ist bekannt, dass AAT nur in einer sehr geringen Konzentration in EBC enthalten ist, was den Nachweis deutlich erschwert. Ein Unterschied der vorliegenden Arbeit zu der

Arbeit von Bayley et al. besteht in dem Versuch, die EBC-Proben vor der eigentlichen Durchführung des ELISAs zu konzentrieren. Dazu wurden die von den Patienten gewonnenen EBC-Proben vor dem Einsetzen in den ELISA lyophilisiert und mit einem geringeren Volumen resuspendiert. So konnte eine wesentlich bessere Konzentration von AAT in EBC erreicht werden.

Ein weiterer ELISA zum Nachweis von AAT wurde von Karnaukhova et al. entwickelt. Diese Arbeitsgruppe beschreibt einen ELISA, der humanes AAT in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten nachweist (Karnaukhova et al., 2007). Der Assay detektiert AAT in einem Bereich von 3,1-50 ng/ml. Es ist also wahrscheinlich, dass dieser Assay nicht sensitiv genug wäre, um AAT zuverlässig und reproduzierbar in EBC nachzuweisen, da sich die AAT-Konzentrationen in dieser Substanz wie beschrieben unterhalb von 3,1 ng/ml befinden können.

Bisher ist keine weitere Arbeit bekannt, in der AAT in EBC mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen wurde. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte AAT-Western Blot stellt eine sehr sensitive Methode zur Detektion von AAT in EBC dar. Die untere Nachweisgrenze von 0,125 ng/ml erlaubt einen Nachweis von geringsten Mengen AAT in einer EBC-Probe. Die Durchführung des entwickelten Blots ist jedoch auch komplexer und erfordert mehr Zeitaufwand als der beschriebene ELISA.

AAT ist im EBC von Patienten mit AAT-Mangel nachweisbar

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob AAT im EBC von Patienten mit AAT-Mangel nachgewiesen werden kann. Es ist gelungen, AAT im EBC von AAT-Patienten sowohl mit dem entwickelten Western Blot als auch mit dem beschriebenen ELISA zu detektieren. Wie im vorangehenden Methoden-Teil beschrieben, wurde das EBC der Patienten an Tag 1, 3 und 6 nach Substitution mit humanem AAT untersucht. Eventuelle Konzentrationsunterschiede des AATs in den Atemwegen der Patienten konnten so über den Verlauf einer Woche beobachtet werden. Im ELISA zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied der AAT-Konzentrationen im Verlauf einer Woche, allerdings die Tendenz, dass nach Substitution höhere Mengen AAT im EBC nachweisbar sind. Auch im durchgeführten Western Blot zeigte die visuelle Auswertung die Tendenz, dass am Tag 6 geringere Mengen AAT nachweisbar sind als an Tag 1. Dies bestätigt Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, die im Serum von

substituierten Patienten mit AAT-Mangel ebenfalls ein Abfall der AAT-Konzentration im Verlauf einer Woche nachwiesen (Wewers et al., 1987).

Weiterhin ist der Eindruck zu gewinnen, dass es zu einer Komplexbildung von AAT und Neutrophiler Elastase (NE) kommt, die nach drei Tagen als Doppelbande nachweisbar ist.

Es existieren keine weiteren Arbeiten, die AAT im EBC von Patienten mit homozygotem oder heterozygotem AAT-Mangel mittels ELISA oder Western Blot nachwiesen. Aktuelle Studien untersuchten AAT bisher hauptsächlich in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Die BAL ist heute eine viel angewandte Methode, um den Flüssigkeitsfilm des unteren Atemwegstraktes zu untersuchen (Haslam et al., 1999). Hierbei wird jedoch gezielt nur ein Segment lavagiert und dann von einer ähnlichen Verteilung in den anderen Segmenten ausgegangen. Elliott et al. beispielsweise gelang erstmals der Nachweis von AAT-Polymeren in Patienten mit homozygotem AAT-Mangel in der BAL (Elliott et al., 1998). Mulgrew et al. wiesen AAT in Lavagen von Patienten mit AAT-Mangel mittels ELISA und Western Blot nach (Mulgrew et al., 2004). Es ist jedoch zu betonen, dass das Gewinnen einer BAL mittels Bronchoskopie eine für den Patienten invasive Untersuchungsmethode darstellt. Die standardisierte Untersuchung des epithelialen Flüssigkeitsfilms und der sichere Nachweis von AAT im EBC wäre eine schnellere, kostengünstigere und vor allem für den Patienten wesentlich angenehmere Form der Bestimmung.

Korrelation von AAT-Werten in EBC und Serum

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Korrelation der gemessenen AAT-Werte im EBC zu den AAT-Werten im Serum untersucht. Patienten mit sowohl heterozygotem als auch homozygotem AAT-Mangel haben, wie oben erläutert, verminderte AAT-Werte im Serum. In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blot, der den AAT-Gehalt im Exhalat eines Gesunden und eines nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel vergleicht, konnte keine Korrelation festgestellt werden. Überraschender Weise zeigte der Patient mit AAT-Mangel eine deutlich stärkere Bande als die gesunde Kontrollperson. Der gemessene AAT-Gehalt im Serum betrug jedoch bei dem Patienten mit AAT-Mangel 0,28 g/l und bei der gesunden Kontrollperson 1,83 g/l.

Bisher liegen keine weiteren Studien vor, die die Korrelation von AAT-Konzentrationen im Serum und im EBC untersuchen. Es konnte bislang keine sichere Erklärung für den stark erhöhten Gehalt von AAT im EBC des Patienten mit homozygotem AAT-Mangel gefunden werden. Es ist jedoch bekannt, dass AAT als Akute-Phase-Protein und Immunmodulator gilt (Fischer et al., 1976). Verschiedene Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass pulmonale Entzündungsvorgänge in Patienten mit homozygotem AAT-Mangel im Vergleich zu Patienten ohne Defekt des PI-Gens verstärkten und qualitativ unterschiedlichen Mechanismen unterliegen. Morrison et al. konnten zeigen, dass Patienten mit homozygotem AAT-Mangel ein erhöhtes Vorkommen von Neutrophilen in der Bronchoalveolären Lavage aufweisen (Morrison et al., 1987). Elliott et al. und Parmar et al. zeigten, dass die in den Alveolen von Patienten mit homozygotem AAT-Mangel vorhandenen AAT-Polymere chemotaktisch auf Neutrophile wirken (Elliott et al., 1998; Parmar et al., 2002). Mahadeva et al. demonstrierten dies erstmals an einem in-vivo Modell (Mahadeva et al., 2005). Demnach hat das krankhaft veränderte AAT-Protein in homozygoten AAT-Patienten durch seine Polymerisation nicht nur eine verminderte Anti-Protease-Funktion, sondern fungiert zusätzlich auch als proinflammatorischer Stimulus. Es ergeben sich dadurch Hinweise darauf, dass es zu einem Regelkreis der Entzündung kommen könnte.

Es ist festzuhalten, dass die genauen pulmonalen Entzündungsvorgänge in Patienten mit homozygotem AAT-Mangel bis heute nicht komplett verstanden werden. Möglicher Weise bestand jedoch bei dem untersuchten AAT-Patienten eine im Serum noch nicht feststellbare inflammatorische Situation, die sich in der starken AAT-Erhöhung im EBC aber schon frühzeitig nachweisen ließ. Dabei ist nicht sicher zu sagen, ob es sich dabei um eine inflammatorische Reaktion des Respirationstraktes oder um eine systemische Inflammation handelte. In einer Arbeit von Luisetti et al., die bislang nur als Abstrakt vorliegt, wurden bei Patienten mit AAT-Mangel und erhöhtem C-reaktiven Protein (CRP) überdurchschnittlich hohe AAT-Werte im Serum gemessen (R.Scabini, 2009). Der Anstieg von AAT als Akute-Phase-Protein kann wahrscheinlich keinen Hinweis auf das von der Inflammation betroffene Kompartiment geben. Es wäre wünschenswert, die gefundenen Daten in einem umfangreicheren Patientenkollektiv zu bestätigen und zu untersuchen. Die Zusammenstellung eines solchen repräsentativen Patientenkollektivs gestaltet sich jedoch in sofern problematisch, als dass es nur sehr wenige Patienten mit homozygotem AAT-Mangel gibt, die nicht substituiert werden. Wie den aktuellen Therapieempfehlungen zu entnehmen ist, wird zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

meist zu dem umgehenden Beginn einer Substitutionstherapie mit humanem AAT geraten, wenn die Lungenfunktion eingeschränkt ist (FEV_1 30 – 65 % predicted).

Vergleich von AAT im EBC der verschiedenen Patientengruppen

In dieser Arbeit sollten weiterhin die AAT-Werte im EBC der gemessenen Patientengruppen verglichen werden. Durch die Entwicklung und Anwendung des oben beschriebenen, sehr sensitiven AAT-ELISAs wurde es möglich, alle gemessenen Gruppen voneinander zu unterscheiden. Im Vergleich der gesunden Kontrollgruppe mit den Patienten mit stabiler und exazerbierter COPD zeigte sich, dass die Patienten mit exazerbierter COPD signifikant höhere AAT-Werte im EBC aufwiesen als Gesunde sowie Patienten mit COPD ohne Exazerbation. Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied der Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe gefunden. Der Anstieg von AAT im EBC der Patienten mit exazerbierter COPD legt die Vermutung nahe, dass AAT auch hier als Akute-Phase-Protein auf die vorherrschende Inflammation des Respirationssystems dieser Patienten reagiert. Es ist weiterhin anzunehmen, dass bei Patienten mit exazerbierter COPD eine wesentlich stärkere Inflammation des Respirationssystems vorliegt als bei Gesunden sowie Patienten mit nicht exazerbierter COPD. Der fehlende Unterschied des AAT-Gehalts im Exhalat von Gesunden und Patienten mit COPD ohne Exazerbation lässt eine weniger entzündliche pulmonale Situation bei Patienten mit stabiler COPD vermuten.

Außer der oben beschriebenen Arbeit von Bayley et al. ist bisher keine weitere Arbeit bekannt, die AAT im EBC von Patienten mit COPD oder exazerbierter COPD untersucht. Es existieren ebenfalls wenige Daten zu Untersuchungen von AAT in Induziertem Sputum (Kobayashi et al., 2004) oder der BAL (Morrison et al., 1987) bei Patienten mit stabiler oder exazerbierter COPD. Es wurden jedoch eine Reihe von Markern für oxidativen Stress und/oder Entzündung im EBC dieser Patientengruppen nachgewiesen. Montuschi et al. zeigten zum Beispiel erhöhte Werte für Prostaglandin E_2 (PGE_2), Leukotrien D_4 (LTD_4), Leukotrien E_4 (LTE_4) und 8-Iso-prostan im EBC von Patienten mit COPD (Montuschi et al., 2003a). Es wurden ebenfalls erhöhte Werte für H_2O_2 (Dekhuijzen et al., 1996), IL-6 (Bucchioni et al., 2003), Nitrit/Nitrat (Kostikas et al., 2002), Nitrosothiol (Corradi et al., 2001) und Thiobarbitat-reaktive Substanzen (Nowak et al., 1999) gefunden. So könnte auch AAT im EBC als leicht zu

bestimmender Marker der Inflammation einer COPD-Exazerbation in Zukunft in Frage kommen.

Bei der Untersuchung der substituierten Patienten mit AAT-Mangel an Tag eins, drei und sechs nach Substitution mit humanem AAT zeigte sich, dass diese Patientengruppe ebenfalls signifikant höhere AAT-Werte im Exhalat aufwiesen als Gesunde und Patienten mit stabiler COPD. Leider beinhalteten die Messungen an Tag eins und drei bei jeweils einem Patienten der Gruppe einen Ausfallwert, weswegen nur die Messung an Tag sechs signifikant war. Würde der Ausreißer in Abb. 12 herausgelassen werden, könnte auch bei dem Vergleich der substituierten Patienten mit AAT-Mangel an Tag eins nach Substitution mit den Gesunden und den Patienten mit stabiler COPD ein signifikanter Unterschied dargestellt werden (Abb. 12*).

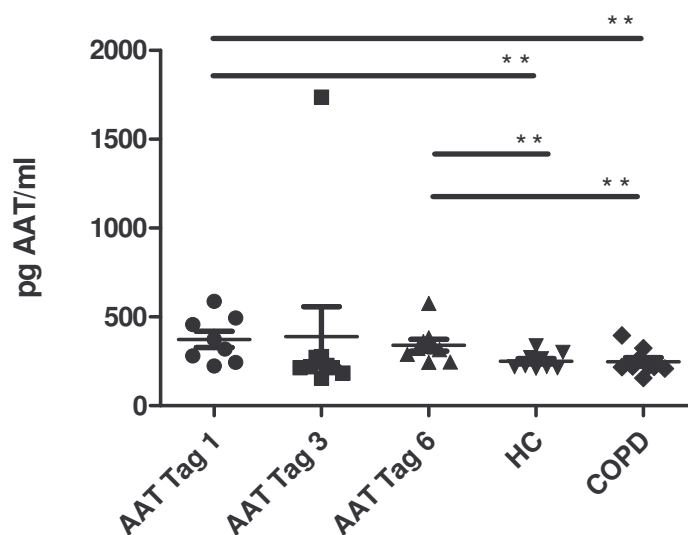


Abb. 12*: Vergleich der AAT-Konzentrationen von Gesunden, COPD-Patienten und substituierten AAT-Patienten im ELISA. Der Ausreißer in der Gruppe der AAT-Patienten an Tag eins nach Substitution ist exemplarisch herausgenommen. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit ** gekennzeichnet.

Es ist jedoch zu vermuten, dass bei einer Wiederholung der Messung mit einem größeren Patientenkollektiv die gefundenen Ergebnisse bestätigt werden würden.

Es stellte sich hier wie auch in dem vorangehend beschriebenen Western Blot die Frage, warum Patienten mit einem serumelektrophoretisch bestätigten AAT-Mangel im Exhalat einen höheren AAT-Gehalt aufweisen als Gesunde oder Patienten mit einer stabilen COPD. Die oben aufgeführten Erläuterungen bezüglich der Rolle von AAT als

Akute-Phase-Protein legen die Vermutung nahe, dass auch im Respirationstrakt von substituierten Patienten mit AAT-Mangel eine vermehrte Entzündungsreaktion vorherrscht.

Bei dem Vergleich der substituierten Patienten mit AAT-Mangel mit nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel wurden deutlich höhere AAT-Werte im Exhalat der nicht substituierten Patienten gefunden. Das bestätigte die Ergebnisse des Western Blots, welcher weiter oben diskutiert wurde. Weiterhin könnte dies bedeuten, dass im Respirationstrakt dieser Patienten eine stärkere Inflammation vorliegt als bei Patienten, die eine Substitutionstherapie mit humanem AAT erhalten. Außerdem unterstützen die gefundenen Ergebnisse Resultate von anderen Arbeitsgruppen, die die Wirksamkeit, d.h. den protektiven Wert der Substitutionstherapie mit humanem AAT untersuchten und bestätigten. Seersholm et al. fanden einen verminderten jährlichen Abfall der FEV₁ bei substituierten AAT-Patienten aus Deutschland im Vergleich zu AAT-Patienten in Dänemark, die keine Substitutionstherapie erhielten (Seersholm et al., 1997). Des Weiteren wurde über eine niedrigere 5-Jahres-Mortalitätsrate bei Patienten mit kontinuierlich erhaltener Augmentationstherapie berichtet (1998). Stockley et al. vermuteten, dass die Substitution von AAT eine Inflammation der Atemwege vermindert (Stockley et al., 2002). Auch Liebermann et al. zeigten, dass Patienten, die substituiert werden, weniger Atemwegsinfektionen aufweisen und dass die Mortalität bei diesen Patienten reduziert ist (Lieberman, 2000).

So erscheint es plausibel, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten mit AAT-Mangel, die sich keiner Substitutionstherapie unterzogen, höhere AAT-Spiegel im EBC zeigten als die substituierten Patienten mit AAT-Mangel. Auch hier ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel um ein sehr kleines Patientenkollektiv handelt. Die gefundenen Ergebnisse müssen anhand von Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden. Diesbezüglich müsste jedoch wahrscheinlich ein nicht-deutsches Vergleichskollektiv aus einem Land gewählt werden, in dem die Substitutionstherapie nicht üblich bzw. möglich ist.

Es sind keine weiteren Studien bekannt, die den AAT-Gehalt im Exhalat von AAT-Patienten mit und ohne Substitutionstherapie verglichen. So stellte sich dennoch die Frage, ob der erhöhte AAT-Gehalt im Exhalat dieser Patienten aus einem Anstieg von AAT als Akute-Phase-Protein resultierte, ob es sich um AAT- Polymere handelte oder

ob die gefundenen Werte einem zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erkannten Messfehler oder Artefakt unterlagen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch Spiking-Experimente durchgeführt, die zeigten, dass AAT, welches der Probe zugegeben wurde, in einem anschließend durchgeführten Western Blot bzw. Elisa wieder nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

Mit dem AAT-ELISA konnte demonstriert werden, dass in der Lunge von Patienten mit homozygotem AAT-Mangel mehr AAT vorliegt als in der Lunge von Patienten mit COPD. Die beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass die Inflammationsmechanismen des Respirationstraktes, besonders bei Patienten mit AAT-Mangel, bislang nicht vollständig verstanden werden.

Deshalb sollten als letzter Punkt in der vorliegenden Arbeit sowohl der pH-Wert als auch IL-8 als Marker der pulmonalen Inflammation im EBC von Patienten mit COPD, Patienten mit exazerbierter COPD, substituierten Patienten mit AAT-Mangel sowie gesunden Kontrollpersonen untersucht werden.

Korrelation der AAT-Werte mit Markern der pulmonalen Inflammation

Zuerst sollten die pH-Werte betrachtet werden, wobei der pH-Wert einen unspezifischen Marker für Inflammation darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit COPD und Patienten mit exazerbierter COPD einen signifikant niedrigeren pH-Wert im EBC aufweisen als Gesunde. Dabei war der mittlere pH-Wert in der Gruppe der Patienten mit exazerbierter COPD niedriger als der mittlere pH-Wert in der Gruppe der Patienten mit stabiler COPD. Die Gruppe der Patienten mit AAT-Mangel wurde an den Tagen eins, drei und sechs nach Substitution mit humanem AAT gemessen. Hier fanden sich leicht erniedrigte pH-Werte im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Nur eine kleine Gruppe an Patienten mit nicht substituiertem homozygotem AAT-Mangel wurde exemplarisch in die Messungen eingeschlossen. Hier konnte jedoch auch kein signifikanter Unterschied zu der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden.

Es existieren einige Arbeiten, die sich mit der Bestimmung des pH-Wertes in EBC beschäftigten und sein Verhalten bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen untersuchten. Unter anderen beschreiben Vaughan et al. die pH-Wert Messung im EBC als eine einfache, nichtinvasive, kostengünstige und reproduzierbare Methode, um eine

inflammatorische Situation der Atemwege individuell darzustellen (Vaughan et al., 2003).

Hunt et al. ermittelten bei gesunden Probanden pH-Werte um 7,7 mit einer Spanne von 7,4 bis 8,8 (Hunt et al., 2000). Deutlich erniedrigte pH-Werte im EBC fanden sich bei akutem Asthma (Hunt et al., 2000; Kostikas et al., 2002), zystischer Fibrose (Tate et al., 2002), COPD (Kostikas et al., 2002), exazerbierter COPD (Kostikas et al., 2002), Bronchiektasen (Kostikas et al., 2002) und akuter Lungenschädigung (ARDS) (Gessner et al., 2003). Kostikas et al. fanden Korrelationen zu eosinophilen bzw. neutrophilen Granulozyten in induziertem Sputum, was die Rolle des pH-Wertes im EBC als Marker für inflammatorische Prozesse in der Lunge unterstreicht (Kostikas et al., 2002). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessenen pH-Werte bestätigen diese Ergebnisse. Der mittlere pH-Wert in der Gruppe der Gesunden betrug 8,18 und liegt damit in dem von Hunt et al. beschriebenen Bereich. Der signifikant niedrigere mittlere pH-Wert im Exhalat der Patienten mit COPD macht die vorherrschende inflammatorische pulmonale Situation bei diesen Patienten deutlich. In logischer Konsequenz konnte bei den Patienten mit exazerbierter COPD ein noch niedrigerer mittlerer pH-Wert als Zeichen der starken Inflammation der Lunge gemessen werden.

Es gibt bisher jedoch keine Arbeit, die den pH-Wert im EBC von Patienten mit homozygotem AAT-Mangel untersucht. Dies ist die erste Arbeit, die sich mit dem pH-Wert von substituierten sowie nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel beschäftigt. Die Patienten mit AAT-Mangel hatten sowohl am Tag eins als auch am Tag drei und sechs nach der wöchentlichen Substitution von humanem AAT nur gering erniedrigte mittlere pH-Werte im Vergleich zu den Gesunden. Mit Western Blot und ELISA konnte sowohl im Exhalat von substituierten als auch im Exhalat von nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel ein erhöhter AAT-Gehalt gezeigt werden. Dies lässt vermuten, dass in beiden Patientengruppen eine vermehrte Inflammation des Respirationstraktes vorliegt. Die dadurch erwarteten niedrigen mittleren pH-Werte in diesen beiden Patientengruppen konnten jedoch nicht gezeigt werden.

Als weiterer Marker der pulmonalen Inflammation wurde IL-8 im EBC aller Patientengruppen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass substituierte Patienten mit AAT Mangel an Tag eins, drei und sechs nach Substitution signifikant höhere IL-8-Werte als Gesunde hatten. Auch im Vergleich zu den Patienten mit COPD wurden signifikant höhere IL-8-Spiegel an allen drei Tagen nach Substitution gemessen.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten IL-8 in EBC. Izquierdo et al. verglichen IL-8-Konzentrationen im EBC von Gesunden, Patienten mit Emphysem und Patienten mit chronischer Bronchitis und fanden erniedrigte Konzentrationen von IL-8 im EBC von Patienten mit Emphysem im Vergleich zu Patienten mit chronischer Bronchitis und der gesunden Kontrollgruppe (Izquierdo et al., 2006). Zihlif et al. konnten IL-8 im EBC weder bei Kindern mit primärer ziliärer Dyskinesie noch in gesunden Kontrollen nachweisen (Zihlif et al., 2006). Simpson et al. wiesen IL-8 im EBC von Rauchern nach, stellten jedoch die Validität des dazu benutzten ELISAs in Frage, wohingegen Sack et al. IL-8 mit einem Multiplex-Assay sicher detektieren konnten (Sack et al., 2006; Simpson et al., 2005). Gessner et al. fanden im Exhalat von beatmeten Patienten mit akuter Lungenschädigung erhöhte IL-6- und IL-8-Konzentrationen, die mit dem EBC-pH korrelierten und schlossen daraus auf das Ausmaß der lokalen pulmonalen Inflammation bei diesen Patienten (Gessner et al., 2003). Im EBC von Patienten mit stabiler COPD fanden Gessner et al. keine signifikant veränderten IL-8-Werte, sondern lediglich im EBC von Patienten mit exazerbierter COPD (Gessner et al., 2009).

Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten IL-8-Werte nicht mit den gemessenen pH-Werten der Patienten mit AAT-Mangel korrelieren ist es dennoch wahrscheinlich, dass die erhöhten IL-8-Werte im EBC auf eine vermehrte pulmonale Inflammation auch bei diesen Patienten hinweisen. Diese Theorie wurde durch den Nachweis eines erhöhten AAT-Gehalts im EBC mittels ELISA und Western Blot im Rahmen dieser Arbeit gestützt. Geht man davon aus, dass AAT auch bei diesen Patienten als Akute-Phase-Protein fungiert und im Rahmen einer vermehrten pulmonalen Inflammation erhöht gemessen werden konnte, ist zu überlegen, ob die erhobenen pH-Werte einem Messfehler unterlagen, oder ob der pH-Wert nicht sensibel genug ist, um die Inflammationsreaktion abzubilden.

Es gibt bisher keine weiteren Arbeiten, die IL-8 im EBC von Patienten mit AAT-Mangel untersuchten. Dies ist die erste Arbeit, in der IL-8 im EBC von Patienten mit substituiertem und nicht substituiertem AAT-Mangel nachgewiesen werden konnte. Einige Arbeitsgruppen beschäftigten sich jedoch mit dem IL-8-Gehalt in verschiedenen anderen Lungenflüssigkeiten bei dieser Patientengruppe. Woolhouse et al. untersuchten Sputum von Patienten mit COPD und von Patienten mit homozygotem AAT-Mangel. Sie fanden deutlich höhere Werte für IL-8 und LTB₄ bei allen Patienten mit AAT-Mangel und schlossen daraus auf eine vermehrte chemotaktische Aktivität im Sputum dieser Patientengruppe (Woolhouse et al., 2002). Malerba et al. konnten eine höhere

Anzahl Neutrophiler und erhöhte IL-8-Werte in Induziertem Sputum auch in Patienten mit heterozygotem AAT-Mangel, verglichen mit Gesunden, zeigen (Malerba et al., 2006). Rouhani et al. untersuchten Lavagen von Gesunden und von Patienten mit homozygotem AAT-Mangel und fanden signifikant höhere IL-8-Werte in der BAL der Patienten mit AAT-Mangel (Rouhani et al., 2000). In diesem Rahmen zeigten auch Stockley et al. sehr ähnliche Entzündungsmechanismen der Atemwegsinflammation von Patienten mit AAT-Mangel und COPD in Induziertem Sputum (Stockley et al., 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen IL-8-Messungen im EBC von AAT-Patienten bestätigen die oben beschriebenen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und regen zu weiteren Untersuchungen der pulmonalen Inflammation bei AAT-Patienten mit Hilfe der Methode des Exhalierten Atemwegskondensats an.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Methode des Exhalierten Atemwegskondensats eine einfach durchführbare, nicht invasive und günstige Methode darstellt. Sie ist besonders gut für Longitudinalstudien sowie zur individuellen Untersuchung besonders chronisch kranker Patienten geeignet, da das Gerät sowohl selbständig von Patienten zu Hause benutzt werden kann, als auch in der Klinik für die Erfassung von Patienten in stabilen sowie exazerbierten Erkrankungsstadien. Die Möglichkeit, nicht invasiv Proteine und Biomarker im EBC zu erfassen und zu untersuchen, erlaubt viel versprechende zukünftige Forschungsansätze. Allerdings müssen auch die Grenzen der Methodik in diesem Zusammenhang angesprochen werden. Bisher ist beispielsweise die Bestimmung des pH-Wertes im EBC gut und zahlreich untersucht, die Messung von Zytokinen oder speziellen Proteinen im EBC erfordert jedoch noch weitere Standardisierungsarbeiten.

Weiterhin konnte AAT erstmals im EBC verschiedener Patientengruppen nachgewiesen werden. Die erhöhten Werte von AAT in Patienten mit AAT-Mangel zeigten dessen Rolle als Akute-Phase-Protein und Inflammationsmarker. Diese Theorie konnte durch weitere Untersuchungen von pH-Wert und IL-8 als Marker der pulmonalen Inflammation unterstrichen werden. Zur Anwendung der beschriebenen Methode sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Routine sind jedoch noch umfangreiche weitere Untersuchungen und standardisierende Arbeiten notwendig.

6 Zusammenfassung

Der Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (AAT-Mangel) ist eine genetische Erkrankung, die den Träger für die Entwicklung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sowie einer Leberzirrhose prädisponiert. Die Hauptfunktion von Alpha-1-Antitrypsin besteht darin, das Lungengewebe gegen den Einfluss von Neutrophiler Elastase (NE) zu schützen. Es ist sehr schwierig, die Konzentration von Alpha-1-Antitrypsin in den verschiedenen Kompartimenten der Lunge zu bestimmen. Die Bronchoskopie gilt bisher als Goldstandard, um den unteren Atemwegstrakt und den bronchialen Flüssigkeitsfilm zu untersuchen.

Die Gewinnung und Untersuchung von Exhaliertem Atemwegskondensat (EBC) stellt die Möglichkeit dar, nicht invasiv wichtige Inhaltsstoffe des epithelialen Atemwegsflüssigkeitsfilms zu beurteilen und Veränderungen der physiologischen Homöostase zu detektieren.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass AAT nicht invasiv in EBC gemessen werden kann. Dazu wurde sowohl ein AAT-ELISA als auch ein AAT-Western Blot etabliert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass AAT auch im EBC von Patienten mit AAT-Mangel nachgewiesen werden kann. Eine Korrelation der gemessenen AAT-Werte im EBC zu den AAT-Werten im Serum konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Als weiteres Ziel dieser Arbeit wurden die AAT-Konzentrationen im EBC von gesunden Kontrollpersonen mit den AAT-Konzentrationen im EBC von Patienten mit stabiler COPD, exazerbierter COPD sowie substituierten und nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel verglichen. Es zeigten sich signifikant höhere AAT-Werte im EBC von Patienten mit exazerbierter COPD gegenüber Patienten mit stabiler COPD und Gesunden. Auch substituierte Patienten mit AAT-Mangel hatten signifikant höhere AAT-Werte im EBC als Gesunde und Patienten mit stabiler COPD. Nicht substituierte Patienten mit AAT-Mangel zeigten signifikant höhere AAT-Werte im Vergleich zu substituierten Patienten mit AAT-Mangel.

Als letzter Punkt dieser Arbeit wurde das Verhalten von pH-Wert und Interleukin-8 (IL-8) als Marker der pulmonalen Inflammation im EBC von Patienten mit stabiler und exazerbierter COPD, substituierten und nicht substituierten Patienten mit AAT-Mangel und von Gesunden untersucht. Es zeigten sich signifikant niedrigere pH-Werte im

Exhalat von Patienten mit stabiler sowie exazerbierter COPD im Vergleich zu Gesunden. Die IL-8 Werte im EBC der Patienten mit AAT-Mangel waren signifikant höher als im EBC der Patienten mit COPD und der Gesunden.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Methode des exhalierten Atemwegskondensats eine nicht invasive, einfach durchzuführende und günstige Methode darstellt. Sie könnte besonders für eine individuelle Messung von Patienten mit stabilen und auch exazerbierten Krankheitsstadien geeignet sein. Es konnte gezeigt werden, dass AAT eine Rolle als Akute-Phase-Protein und Inflammationsmarker besitzt. Besonders bei inflammatorischen Prozessen in der Lunge kommt ihm eine wichtige Bedeutung zu. Bis jetzt ist jedoch noch nicht sicher geklärt, ob die erhöht gemessenen AAT-Werte auf eine lokale oder eine systemische Reaktion zurückzuführen sind. Für eine routinemäßige Anwendung der beschriebenen Methode sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Praxis sind jedoch noch umfangreiche weiterführende Experimente und Untersuchungen notwendig.

7 Abstract

Alpha-1-antitrypsin deficiency (AATD) is a genetic disorder that predisposes to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and liver cirrhosis. The main function of alpha-1-antitrypsin (AAT) is to protect the lungs against neutrophil elastase. It is difficult to measure the levels of AAT in different compartments of the lung. Bronchoscopy is still the gold standard to assess the lower respiratory tract and the epithelial lining fluid (ELF). Measurement of exhaled breath condensate (EBC) is a non invasive method to investigate parameters of the epithelial lining fluid of the lung and to detect changes in physiological homeostasis.

It was the aim of the study to show that AAT is measurable with the non invasive method of EBC. An AAT-ELISA and AAT-Western Blot were standardized to detect very small amounts of AAT in EBC. AAT was also measurable in patients with AATD. No correlation could be found between AAT-serum-levels and AAT-levels in EBC.

A further aim of this study was to compare AAT-levels in EBC of healthy controls (HC), patients with stable and exacerbated COPD as well as augmented and non-augmented patients with AATD. Patients with exacerbated COPD had significantly increased AAT-values compared to HCs and patients with stable COPD. Augmented patients with AATD had also significantly higher AAT-values in EBC compared to HCs and patients with stable COPD. Furthermore, non augmented AATD-patients showed significantly higher AAT-values compared with augmented AATD-patients.

In a final step pH- and interleukin-8-values (IL-8) as markers of pulmonary inflammation were measured in EBC from patients with stable and exacerbated COPD, augmented and non augmented patients with AATD and from healthy controls. Patients with stable and exacerbated COPD showed significantly lower pH-values compared to HCs. IL-8-values in EBC of patients with AATD were significantly higher than in patients with COPD and HCs.

In conclusion we found EBC collection is extremely simple to perform, non invasive, inexpensive and reproducible. Therefore, it is well-suited for non invasive analysis in longitudinal follow-ups and individual monitoring of patients with chronicle disease.

It could be shown that AAT has an important role as acute-phase-protein and marker of inflammation. Especially in inflammatory processes of the lung it has major impact. More standardization work must be done to improve the method of EBC for future approach.

8 Literaturverzeichnis

(1997). Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. Bull. World Health Organ **75**, 397-415.

Ref Type: Journal

(1998). Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. Am. J. Respir. Crit Care Med. **158**, 49-59.

Ref Type: Journal

(2001). Patients at high risk of death after lung-volume-reduction surgery. N. Engl. J. Med. **345**, 1075-1083.

Ref Type: Journal

(2003). American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. Am. J. Respir. Crit Care Med. **168**, 818-900.

Ref Type: Journal

(2006). GOLD 2006. GOLD 2006 [http://www. goldcopd. org](http://www.goldcopd.org) .

Ref Type: Journal

ANTHONISEN,N.R., CONNETT,J.E., KILEY,J.P., et al. (1994). Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. JAMA **272**, 1497-1505.

Ref Type: Journal

ANTHONISEN,N.R., MANFREDA,J., WARREN,C.P., HERSHFIELD,E.S., HARDING,G.K., and NELSON,N.A. (1987). Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Ann Intern Med. **106**, 196-204.

Ref Type: Journal

BAKKER,M.E., STOLK,J., PUTTER,H., et al. (2005). Variability in densitometric assessment of pulmonary emphysema with computed tomography. Invest Radiol. **40**, 777-783.

Ref Type: Journal

BALINT,B., DONNELLY,L.E., HANAZAWA,T., KHARITONOV,S.A., and BARNES,P.J. (2001). Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* **56**, 456-461.

Ref Type: Journal

BASLUND,B., SZPIRT,W., ERIKSSON,S., et al. (1996). Complexes between proteinase 3, alpha 1-antitrypsin and proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies: a comparison between alpha 1-antitrypsin PiZ allele carriers and non-carriers with Wegener's granulomatosis. *Eur. J. Clin. Invest* **26**, 786-792.

Ref Type: Journal

BAYLEY,D.L., ABUSRIWIL,H., AHMAD,A., and STOCKLEY,R.A. (2008). Validation of assays for inflammatory mediators in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J* **31**, 943-948.

Ref Type: Journal

BEATTY,K., BIETH,J., and TRAVIS,J. (1980). Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **255**, 3931-3934.

Ref Type: Journal

BECKMAN,G., BECKMAN,L., and LIDEN,S. (1980). Association between psoriasis and the alpha 1-antitrypsin deficiency gene Z. *Acta Derm. Venereol.* **60**, 163-164.

Ref Type: Journal

BEINERT,T., BRAND,P., BEHR,J., VOGELMEIER,C., and HEYDER,J. (1995). Peripheral airspace dimensions in patients with COPD. *Chest* **108**, 998-1003.

Ref Type: Journal

BILLINGSLEY,G.D., WALTER,M.A., HAMMOND,G.L., and COX,D.W. (1993). Physical mapping of four serpin genes: alpha 1-antitrypsin, alpha 1-antichymotrypsin, corticosteroid-binding globulin, and protein C inhibitor, within a 280-kb region on chromosome I4q32.1. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 343-353.

Ref Type: Journal

BRANTLY,M.L., PAUL,L.D., MILLER,B.H., FALK,R.T., WU,M., and CRYSTAL,R.G. (1988). Clinical features and history of the destructive lung disease associated with alpha-1-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 327-336.

Ref Type: Journal

BRANTLY,M.L., WITTES,J.T., VOGELMEIER,C.F., HUBBARD,R.C., FELLOWS,G.A., and CRYSTAL,R.G. (1991). Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes.

Chest **100**, 703-708.

Ref Type: Journal

BUCCHIONI,E., KHARITONOV,S.A., ALLEGRA,L., and BARNES,P.J. (2003). High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. Respir. Med. **97**, 1299-1302.

Ref Type: Journal

CARPAGNANO,G.E., BARNES,P.J., GEDDES,D.M., HODSON,M.E., and KHARITONOV,S.A. (2003). Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit Care Med. **167**, 1109-1112.

Ref Type: Journal

CARPENTER,C.T., PRICE,P.V., and CHRISTMAN,B.W. (1998). Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. Chest **114**, 1653-1659.

Ref Type: Journal

CASSINA,P.C., TESCHLER,H., KONIETZKO,N., THEEGARTEN,D., and STAMATIS,G. (1998). Two-year results after lung volume reduction surgery in alpha1-antitrypsin deficiency versus smoker's emphysema. Eur. Respir. J. **12**, 1028-1032.

Ref Type: Journal

CHEAH,F.C., DARLOW,B.A., and WINTERBOURN,C.C. (2003). Problems associated with collecting breath condensate for the measurement of exhaled hydrogen peroxide from neonates on respiratory support. Biol. Neonate **84**, 338-341.

Ref Type: Journal

COLP,C., PAPPAS,J., MORAN,D., and LIEBERMAN,J. (1993). Variants of alpha 1-antitrypsin in Puerto Rican children with asthma. Chest **103**, 812-815.

Ref Type: Journal

COMBS,C., BRUNT,E.M., SOLOMON,H., BACON,B.R., BRANTLY,M., and DI BISCEGLIE,A.M. (1997). Rapid development of hepatic alpha1-antitrypsin globules after liver transplantation for chronic hepatitis C. Gastroenterology **112**, 1372-1375.

Ref Type: Journal

COOPER,J.D., PATTERSON,G.A., SUNDARESAN,R.S., et al. (1996). Results of 150 consecutive bilateral lung volume reduction procedures in patients with severe emphysema. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **112**, 1319-1329.

Ref Type: Journal

CORRADI,M., FOLESANI,G., ANDREOLI,R., et al. (2003a). Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. Am. J.

Respir. Crit Care Med. **167**, 395-399.

Ref Type: Journal

CORRADI,M., MONTUSCHI,P., DONNELLY,L.E., PESCI,A., KHARITONOV,S.A., and BARNES,P.J. (2001). Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. Am. J Respir. Crit Care Med **163**, 854-858.

Ref Type: Journal

CORRADI,M., RUBINSTEIN,I., ANDREOLI,R., et al. (2003b). Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am. J. Respir. Crit Care Med. **167**, 1380-1386.

Ref Type: Journal

COX,D.W., MARKOVIC,V.D., and TESHIMA,I.E. (1982). Genes for immunoglobulin heavy chains and for alpha 1-antitrypsin are localized to specific regions of chromosome 14q. Nature **297**, 428-430.

Ref Type: Journal

CUVELIER,A., MUIR,J.F., HELLOT,M.F., et al. (2000). Distribution of alpha(1)-antitrypsin alleles in patients with bronchiectasis. Chest **117**, 415-419.

Ref Type: Journal

DAVIS,I.D., BURKE,B., FREESE,D., SHARP,H.L., and KIM,Y. (1992). The pathologic spectrum of the nephropathy associated with alpha 1-antitrypsin deficiency. Hum. Pathol. **23**, 57-62.

Ref Type: Journal

DE SERRES,F.J. (2002). Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. Chest **122**, 1818-1829.

Ref Type: Journal

DEKHUIJZEN,P.N., ABEN,K.K., DEKKER,I., et al. (1996). Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. Am. J Respir. Crit Care Med **154**, 813-816.

Ref Type: Journal

DIRKSEN,A., DIJKMAN,J.H., MADSEN,F., et al. (1999). A randomized clinical trial of alpha(1)-antitrypsin augmentation therapy. Am. J. Respir. Crit Care Med. **160**, 1468-1472.

Ref Type: Journal

DIRKSEN,A., PIITULAINEN,E., PARR,D.G., et al. (2009). Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in alpha1-antitrypsin

deficiency. *Eur. Respir. J* **33**, 1345-1353.
Ref Type: Journal

DOEGLAS,H.M., KLASSEN,E.C., and BLEUMINK,E. (1985). Alpha 1-antitrypsin deficiency and PI typing in patients with chronic urticaria. *Br. J. Dermatol.* **112**, 381-385.
Ref Type: Journal

DOWSON,L.J., GUEST,P.J., and STOCKLEY,R.A. (2001). Longitudinal changes in physiological, radiological, and health status measurements in alpha(1)-antitrypsin deficiency and factors associated with decline. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **164**, 1805-1809.
Ref Type: Journal

EDEN,E., MITCHELL,D., MEHLMAN,B., et al. (1997). Atopy, asthma, and emphysema in patients with severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **156**, 68-74.
Ref Type: Journal

EFFROS,R.M. (2001). Endogenous airway acidification: implications for asthma pathology. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 293-294.
Ref Type: Journal

EFFROS,R.M. (2003). Do low exhaled condensate NH₄⁺ concentrations in asthma reflect reduced pulmonary production? *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **167**, 91-92.
Ref Type: Journal

EFFROS,R.M. (2004a). Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir. Med.* **98**, 682.
Ref Type: Journal

EFFROS,R.M. (2004b). Exhaled breath condensate pH. *Eur. Respir. J.* **23**, 961-962.
Ref Type: Journal

EFFROS,R.M., HOAGLAND,K.W., BOSBOUS,M., et al. (2002). Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**, 663-669.
Ref Type: Journal

EIGENBRODT,M.L., MCCASHLAND,T.M., DY,R.M., CLARK,J., and GALATI,J. (1997). Heterozygous alpha 1-antitrypsin phenotypes in patients with end stage liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **92**, 602-607.
Ref Type: Journal

ELLIOTT,P.R., BILTON,D., and LOMAS,D.A. (1998). Lung polymers in Z alpha1-antitrypsin deficiency-related emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 670-674.
Ref Type: Journal

ELZOUKI,A.N. and ERIKSSON,S. (1996). Risk of hepatobiliary disease in adults with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ): is chronic viral hepatitis B or C an additional risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 989-994.
Ref Type: Journal

ELZOUKI,A.N., LINDGREN,S., NILSSON,S., VERESS,B., and ERIKSSON,S. (1997). Severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZ homozygosity) with membranoproliferative glomerulonephritis and nephrotic syndrome, reversible after orthotopic liver transplantation. *J. Hepatol.* **26**, 1403-1407.
Ref Type: Journal

ELZOUKI,A.N., SEGELMARK,M., WIESLANDER,J., and ERIKSSON,S. (1994). Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J. Intern. Med.* **236**, 543-548.
Ref Type: Journal

ELZOUKI,A.N., STERNER,G., and ERIKSSON,S. (1995). Henoch-Schonlein purpura and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**, 1454-1457.
Ref Type: Journal

ENRIGHT,P.L., CONNETT,J.E., KANNER,R.E., JOHNSON,L.R., and LEE,W.W. (1995). Spirometry in the Lung Health Study: II. Determinants of short-term intraindividual variability. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **151**, 406-411.
Ref Type: Journal

ERIKSSON,S. (1964). Pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Med Scand* **175**, 197-205.
Ref Type: Journal

ERIKSSON,S. (1999). Alpha 1-antitrypsin deficiency. *J. Hepatol.* **30 Suppl 1**, 34-39.
Ref Type: Journal

ESNAULT,V.L., TESTA,A., AUDRAIN,M., et al. (1993). Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int.* **43**, 1329-1332.
Ref Type: Journal

FAIRCHILD,C.I. and STAMPFER,J.F. (1987). Particle concentration in exhaled breath. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **48**, 948-949.
Ref Type: Journal

FISCHER,C.L., GILL,C., FORRESTER,M.G., and NAKAMURA,R. (1976). Quantitation of "acute-phase proteins" postoperatively. Value in detection and monitoring of complications. *Am. J Clin Pathol.* **66**, 840-846.

Ref Type: Journal

FORTIN,P.R., FRASER,R.S., WATTS,C.S., and ESDAILE,J.M. (1991). Alpha-1 antitrypsin deficiency and systemic necrotizing vasculitis. *J. Rheumatol.* **18**, 1613-1616.

Ref Type: Journal

FOSTER,W.L., JR., GIMENEZ,E.I., ROUBIDOUX,M.A., et al. (1993). The emphysemas: radiologic-pathologic correlations. *Radiographics* **13**, 311-328.

Ref Type: Journal

FRANCIOSI,L.G., PAGE,C.P., CELLI,B.R., et al. (2006). Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* **7**, 74.

Ref Type: Journal

FRITTER,D., KNOBLER,C.M., and BEYSENS,D.A. (1991). Experiments and simulation of the growth of droplets on a surface (breath figures). *Phys. Rev. A* **43**, 2858-2869.

Ref Type: Journal

GADEK,J.E., FELLIS,G.A., ZIMMERMAN,R.L., RENNARD,S.I., and CRYSTAL,R.G. (1981). Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J. Clin. Invest* **68**, 889-898.

Ref Type: Journal

GAREY,K.W., NEUHAUSER,M.M., ROBBINS,R.A., DANZIGER,L.H., and RUBINSTEIN,I. (2004). Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* **125**, 22-26.

Ref Type: Journal

GELB,A.F., MCKENNA,R.J., BRENNER,M., FISCHER,R., and ZAMEL,N. (1999). Lung function after bilateral lower lobe lung volume reduction surgery for alpha1-antitrypsin emphysema. *Eur. Respir. J.* **14**, 928-933.

Ref Type: Journal

GESSNER,C., HAMMERSCHMIDT,S., KUHN,H., et al. (2003). Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury. *Respir. Med.* **97**, 1188-1194.

Ref Type: Journal

GESSNER,C., KUHN,H., SEYFARTH,H.J., et al. (2001). Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* **55**, 414-419.

Ref Type: Journal

GESSNER,C., RECHNER,B., HAMMERSCHMIDT,S., et al. (2009). Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. Lung Cancer .
Ref Type: Journal

GISHEN,P., SAUNDERS,A.J., TOBIN,M.J., and HUTCHISON,D.C. (1982). Alpha 1-antitrypsin deficiency: the radiological features of pulmonary emphysema in subjects of Pi type Z and Pi type SZ: a survey by the British Thoracic Association. Clin. Radiol. **33**, 371-377.
Ref Type: Journal

GLASGOW,J.F., LYNCH,M.J., HERCZ,A., LEVISON,H., and SASS-KORTSAK,A. (1973). Alpha 1 antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. Am. J. Med. **54**, 181-194.
Ref Type: Journal

GRAF,H., STAMATIS,G., and KONIETZKO,N. (1991). Einseitige Bullektomie bei Patienten mit Lungenemphysem auf dem Boden eines schweren Alpha 1-Pi-Mangels unter Substitution. Z. Herz-,Thorax-,Gefäßchir. **5** 28-32.
Ref Type: Journal

GRIESE,M., NOSS,J., and VON,B.C. (2002). Protein pattern of exhaled breath condensate and saliva. Proteomics. **2**, 690-696.
Ref Type: Journal

GUATURA,S.B., MARTINEZ,J.A., SANTOS BUENO,P.C., and SANTOS,M.L. (2000). Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption. Sao Paulo Med. J. **118**, 93-98.
Ref Type: Journal

GUEST,P.J. and HANSELL,D.M. (1992). High resolution computed tomography (HRCT) in emphysema associated with alpha-1-antitrypsin deficiency. Clin. Radiol. **45**, 260-266.
Ref Type: Journal

HAFAEEZ,W., CILIBERTO,G., and PERLMUTTER,D.H. (1992). Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. J. Clin. Invest **89**, 1214-1222.
Ref Type: Journal

HASLAM,P.L. and BAUGHMAN,R.P. (1999). Report of ERS Task Force: guidelines for measurement of acellular components and standardization of BAL. Eur. Respir. J. **14**, 245-248.
Ref Type: Journal

HENG,M.C., MOY,R.L., and LIEBERMAN,J. (1985). alpha 1-Antitrypsin deficiency in severe psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **112**, 129-133.

Ref Type: Journal

HORVATH,I., HUNT,J., BARNES,P.J., et al. (2005). Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* **26**, 523-548.

Ref Type: Journal

HOSENPUD,J.D., NOVICK,R.J., BREEN,T.J., KECK,B., and DAILY,P. (1995). The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twelfth official report--1995. *J. Heart Lung Transplant.* **14**, 805-815.

Ref Type: Journal

HUNT,J.F., ERWIN,E., PALMER,L., et al. (2002). Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**, 101-107.

Ref Type: Journal

HUNT,J.F., FANG,K., MALIK,R., et al. (2000). Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **161**, 694-699.

Ref Type: Journal

HUSZAR,E., VASS,G., VIZI,E., et al. (2002). Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur. Respir. J.* **20**, 1393-1398.

Ref Type: Journal

HUTCHISON,D.C. (1988). Natural history of alpha-1-protease inhibitor deficiency. *Am. J. Med.* **84**, 3-12.

Ref Type: Journal

IBARGUEN,E., GROSS,C.R., SAVIK,S.K., and SHARP,H.L. (1990). Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency: prognostic indicators. *J. Pediatr.* **117**, 864-870.

Ref Type: Journal

IZQUIERDO,J.L., ALMONACID,C., PARRA,T., and PEREZ,J. (2006). [Systemic and lung inflammation in 2 phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch. Bronconeumol.* **42**, 332-337.

Ref Type: Journal

JACKSON,A.S., SANDRINI,A., CAMPBELL,C., CHOW,S., THOMAS,P.S., and YATES,D.H. (2007). Comparison of biomarkers in exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **175**, 222-227.

Ref Type: Journal

JANUS,E.D., PHILLIPS,N.T., and CARRELL,R.W. (1985). Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet* **1**, 152-154.

Ref Type: Journal

JENSEN,R.L., TEETER,J.G., ENGLAND,R.D., et al. (2007). Sources of long-term variability in measurements of lung function: implications for interpretation and clinical trial design. *Chest* **132**, 396-402.

Ref Type: Journal

JOBSIS,Q., RAATGEEP,H.C., SCHELLEKENS,S.L., HOP,W.C., HERMANS,P.W., and DE JONGSTE,J.C. (1998). Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur. Respir. J.* **12**, 483-485.

Ref Type: Journal

JONES,P.W., QUIRK,F.H., and BAVEYSTOCK,C.M. (1991). The St George's Respiratory Questionnaire. *Respir. Med.* **85 Suppl B**, 25-31.

Ref Type: Journal

KARNAUKHOVA,E., GOLDING,B., and OPHIR,Y. (2007). Development and evaluation of an ELISA for quantification of human alpha-1-proteinase inhibitor in complex biological mixtures. *Biologicals* **35**, 285-295.

Ref Type: Journal

KIETZMANN,D., KAHL,R., MULLER,M., BURCHARDI,H., and KETTLER,D. (1993). Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS. *Intensive Care Med.* **19**, 78-81.

Ref Type: Journal

KOBAYASHI,M., NASUHARA,Y., BETSUYAKU,T., et al. (2004). Effect of low-dose theophylline on airway inflammation in COPD. *Respirology*. **9**, 249-254.

Ref Type: Journal

KOCZULLA,A.R., NOESKE,S., HERR,C., et al. (2010). Acute and Chronic Effects of Smoking on Inflammation Markers in Exhaled Breath Condensate in Current Smokers. *Respiration* **79**, 61-67.

Ref Type: Journal

KOCZULLA,A., BALS,R., and VOGELMEIER,C. (2008a). Alpha-1-Antitrypsin Labor und Register für Personen mit Alpha-1-Antitrypsin Mangel. submitted .

Ref Type: Journal

KOCZULLA,A., DRAGONIERI,S., VOGELMEIER,C., et al. (2008b). Comparison of exhaled breath condensate pH using two commercially devices in healthy controls, asthma and COPD patients. submitted .

Ref Type: Journal

KOSTIKAS,K., PAPATHEODOROU,G., GANAS,K., PSATHAKIS,K., PANAGOU,P., and LOUKIDES,S. (2002). pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**, 1364-1370.
Ref Type: Journal

KUEPPERS,F. and BLACK,L.F. (1974). Alpha1-antitrypsin and its deficiency. *Am. Rev. Respir. Dis.* **110**, 176-194.
Ref Type: Journal

LAURELL,C.-B. and ERIKSSON,S. (1963). The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1 antitrypsin deficiency. *Scan J Clin Lab Invest* **15**, 132-140.
Ref Type: Journal

LAURELL,C.B. and ERIKSSON,S. (1965). THE SERUM ALPHA-L-ANTITRYPSIN IN FAMILIES WITH HYPO-ALPHA-L-ANTITRYPSINEMIA. *Clin. Chim. Acta* **11**, 395-398.
Ref Type: Journal

LEVY,M. (1986). Severe deficiency of alpha 1-antitrypsin associated with cutaneous vasculitis, rapidly progressive glomerulonephritis, and colitis. *Am. J. Med.* **81**, 363-364.
Ref Type: Journal

LEWIS,M., KALLENBACH,J., ZALTZMAN,M., et al. (1985). Severe deficiency of alpha 1-antitrypsin associated with cutaneous vasculitis, rapidly progressive glomerulonephritis, and colitis. *Am. J. Med.* **79**, 489-494.
Ref Type: Journal

LIEBERMAN,J. (2000). Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest* **118**, 1480-1485.
Ref Type: Journal

LOMAS,D.A., EVANS,D.L., FINCH,J.T., and CARRELL,R.W. (1992). The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature* **357**, 605-607.
Ref Type: Journal

LONG,G.L., CHANDRA,T., WOO,S.L., DAVIE,E.W., and KURACHI,K. (1984). Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry* **23**, 4828-4837.
Ref Type: Journal

MAHADEVA,R., ATKINSON,C., LI,Z., et al. (2005). Polymers of Z alpha1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am. J Pathol.* **166**, 377-386.
Ref Type: Journal

MALERBA,M., RICCIARDOLO,F., RADAELI,A., et al. (2006). Neutrophilic inflammation and IL-8 levels in induced sputum of alpha-1-antitrypsin PiMZ subjects. *Thorax* **61**, 129-133.

Ref Type: Journal

MARCUS,N., TECKMAN,J.H., and PERLMUTTER,D.H. (1998). Alpha1-antitrypsin deficiency: from genotype to childhood disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**, 65-74.

Ref Type: Journal

MCCAFFERTY,J.B., BRADSHAW,T.A., TATE,S., GREENING,A.P., and INNES,J.A. (2004). Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax* **59**, 694-698.

Ref Type: Journal

MCELVANEY,N.G., STOLLER,J.K., BUIST,A.S., et al. (1997). Baseline characteristics of enrollees in the National Heart, Lung and Blood Institute Registry of alpha 1-antitrypsin deficiency. Alpha 1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Chest* **111**, 394-403.

Ref Type: Journal

MONTUSCHI,P., CORRADI,M., CIABATTONI,G., NIGHTINGALE,J., KHARITONOV,S.A., and BARNES,P.J. (1999). Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **160**, 216-220.

Ref Type: Journal

MONTUSCHI,P., KHARITONOV,S.A., CIABATTONI,G., and BARNES,P.J. (2003a). Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* **58**, 585-588.

Ref Type: Journal

MONTUSCHI,P., KHARITONOV,S.A., CIABATTONI,G., et al. (2000). Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* **55**, 205-209.

Ref Type: Journal

MONTUSCHI,P., RAGAZZONI,E., VALENTE,S., et al. (2003b). Validation of leukotriene B4 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm. Res.* **52**, 69-73.

Ref Type: Journal

MONTUSCHI,P., RAGAZZONI,E., VALENTE,S., et al. (2003c). Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E(2) measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm. Res.* **52**, 502-507.

Ref Type: Journal

MORRISON,H.M., KRAMPS,J.A., BURNETT,D., and STOCKLEY,R.A. (1987). Lung lavage fluid from patients with alpha 1-proteinase inhibitor deficiency or chronic obstructive bronchitis: anti-elastase function and cell profile. Clin Sci. (Lond) **72**, 373-381.

Ref Type: Journal

MORSE,J.O. (1978a). Alpha1-antitrypsin deficiency (second of two parts). N. Engl. J. Med. **299**, 1099-1105.

Ref Type: Journal

MORSE,J.O. (1978b). alpha1-antitrypsin deficiency (first of two parts). N. Engl. J. Med. **299**, 1045-1048.

Ref Type: Journal

MULGREW,A.T., TAGGART,C.C., LAWLESS,M.W., et al. (2004). Z alpha1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. Chest **125**, 1952-1957.

Ref Type: Journal

MULLER,N.L. and COXSON,H. (2002). Chronic obstructive pulmonary disease. 4: imaging the lungs in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax **57**, 982-985.

Ref Type: Journal

MUTLU,G.M., GAREY,K.W., ROBBINS,R.A., DANZIGER,L.H., and RUBINSTEIN,I. (2001). Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. Am. J. Respir. Crit Care Med. **164**, 731-737.

Ref Type: Journal

NEEDHAM,M. and STOCKLEY,R.A. (2004). Alpha 1-antitrypsin deficiency. 3: Clinical manifestations and natural history. Thorax **59**, 441-445.

Ref Type: Journal

NEMETH,A. (1999). Liver transplantation in alpha(1)-antitrypsin deficiency. Eur. J. Pediatr. **158 Suppl 2**, S85-S88.

Ref Type: Journal

NOWAK,D., ANTCZAK,A., KROL,M., et al. (1996). Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. Eur. Respir. J. **9**, 652-657.

Ref Type: Journal

NOWAK,D., KALUCKA,S., BIALASIEWICZ,P., and KROL,M. (2001). Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. Free Radic. Biol. Med. **30**, 178-186.

Ref Type: Journal

NOWAK,D., KASIELSKI,M., ANTCZAK,A., PIETRAS,T., and BIALASIEWICZ,P. (1999). Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir. Med* **93**, 389-396.
Ref Type: Journal

NOWICKI,M.L. and FREIER,E.F. (1990). Improved method for identifying alpha 1-antitrypsin Pi M subtypes by isoelectric focusing in agarose. *Clin. Chem.* **36**, 1815-1819.
Ref Type: Journal

OKAYAMA,H., BRANTLY,M., HOLMES,M., and CRYSTAL,R.G. (1991). Characterization of the molecular basis of the alpha 1-antitrypsin F allele. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 1154-1158.
Ref Type: Journal

OWEN,M.C., BRENNAN,S.O., LEWIS,J.H., and CARRELL,R.W. (1983). Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* **309**, 694-698.
Ref Type: Journal

PAPINENI,R.S. and ROSENTHAL,F.S. (1997). The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J. Aerosol Med.* **10**, 105-116.
Ref Type: Journal

PARMAR,J.S., MAHADEVA,R., REED,B.J., et al. (2002). Polymers of alpha(1)-antitrypsin are chemotactic for human neutrophils: a new paradigm for the pathogenesis of emphysema. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 723-730.
Ref Type: Journal

PIITULAINEN,E. and ERIKSSON,S. (1999). Decline in FEV1 related to smoking status in individuals with severe alpha1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Eur. Respir. J.* **13**, 247-251.
Ref Type: Journal

PIITULAINEN,E. and SVEGER,T. (1998a). Effect of environmental and clinical factors on lung function and respiratory symptoms in adolescents with alpha1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr.* **87**, 1120-1124.
Ref Type: Journal

PIITULAINEN,E., TORNLING,G., and ERIKSSON,S. (1998b). Environmental correlates of impaired lung function in non-smokers with severe alpha 1-antitrypsin deficiency (PiZZ). *Thorax* **53**, 939-943.
Ref Type: Journal

PRACHALIAS,A.A., KALIFE,M., FRANCAVILLA,R., et al. (2000). Liver transplantation for alpha-1-antitrypsin deficiency in children. *Transpl. Int.* **13**, 207-210.
Ref Type: Journal

QIZILBASH,A. and YOUNG-PONG,O. (1983). Alpha 1 antitrypsin liver disease differential diagnosis of PAS-positive, diastase-resistant globules in liver cells. *Am. J. Clin. Pathol.* **79**, 697-702.
Ref Type: Journal

R.SCABINI,B.M.G.T.S.O.B.Z.K.F.M.I.F.B.M.L. (2009). **Measurement of Alpha1-Antitrypsin and C-Reactive Protein Level in Dried Blood Spot Fluid** . ATS 2009 , Abstract .
Ref Type: Journal

RAWLINGS,W., JR., KREISS,P., LEVY,D., et al. (1976). Clinical, epidemiologic, and pulmonary function studies in alpha,-antitrypsin-deficient subjects of Pi Z type. *Am. Rev. Respir. Dis.* **114**, 945-953.
Ref Type: Journal

ROLLINI,P. and FOURNIER,R.E. (2000). Differential regulation of gene activity and chromatin structure within the human serpin gene cluster at 14q32.1 in macrophage microcell hybrids. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1767-1777.
Ref Type: Journal

ROUHANI,F., PAONE,G., SMITH,N.K., KREIN,P., BARNES,P., and BRANTLY,M.L. (2000). Lung neutrophil burden correlates with increased pro-inflammatory cytokines and decreased lung function in individuals with alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* **117**, 250S-251S.
Ref Type: Journal

SACK,U., SCHEIBE,R., WOTZEL,M., et al. (2006). Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A* **69**, 169-172.
Ref Type: Journal

SAVIGE,J.A., CHANG,L., COOK,L., BURDON,J., DASKALAKIS,M., and DOERY,J. (1995). Alpha 1-antitrypsin deficiency and anti-proteinase 3 antibodies in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **100**, 194-197.
Ref Type: Journal

SCHEIDELER,L., MANKE,H.G., SCHWULERA,U., INACKER,O., and HAMMERLE,H. (1993). Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**, 778-784.
Ref Type: Journal

SCHMIDT,E.W., RASCHE,B., ULMER,W.T., et al. (1988). Replacement therapy for alpha-1-protease inhibitor deficiency in PiZ subjects with chronic obstructive lung disease. *Am. J. Med.* **84**, 63-69.

Ref Type: Journal

SCHREIBER,J., MEYER,C., RUSCH-GERDES,S., et al. (2002). Mycobacterium tuberculosis gene-amplification in breath condensate of patients with lung tuberculosis. *Eur. J Med. Res.* **7**, 290-291.

Ref Type: Journal

SEERSHOLM,N., KOK-JENSEN,A., and DIRKSEN,A. (1995). Decline in FEV1 among patients with severe hereditary alpha 1-antitrypsin deficiency type PiZ. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **152**, 1922-1925.

Ref Type: Journal

SEERSHOLM,N., WENCKER,M., BANIK,N., et al. (1997). Does alpha1-antitrypsin augmentation therapy slow the annual decline in FEV1 in patients with severe hereditary alpha1-antitrypsin deficiency? Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie von Lungenerkrankungen (WATL) alpha1-AT study group. *Eur. Respir. J.* **10**, 2260-2263.

Ref Type: Journal

SHAHID,S.K., KHARITONOV,S.A., WILSON,N.M., BUSH,A., and BARNES,P.J. (2002). Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **165**, 1290-1293.

Ref Type: Journal

SHARP,H.L., BRIDGES,R.A., KRIVIT,W., and FREIER,E.F. (1969). Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J. Lab Clin. Med.* **73**, 934-939.

Ref Type: Journal

SHIN,M.S. and HO,K.J. (1993). Bronchiectasis in patients with alpha 1-antitrypsin deficiency. A rare occurrence? *Chest* **104**, 1384-1386.

Ref Type: Journal

SIDORENKO,G.I., ZBOROVSKII,E.I., and LEVINA,D.I. (1980). [Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)]. *Ter. Arkh.* **52**, 65-68.

Ref Type: Journal

SILVERMAN,E.K., MILETICH,J.P., PIERCE,J.A., et al. (1989). Alpha-1-antitrypsin deficiency. High prevalence in the St. Louis area determined by direct population screening. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 961-966.

Ref Type: Journal

SIMPSON,J.L., WOOD,L.G., and GIBSON,P.G. (2005). Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp. Allergy* **35**, 1180-1185.

Ref Type: Journal

SMITH,K.C., SU,W.P., PITTELKOW,M.R., and WINKELMANN,R.K. (1989). Clinical and pathologic correlations in 96 patients with panniculitis, including 15 patients with deficient levels of alpha 1-antitrypsin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 1192-1196.

Ref Type: Journal

SOEJIMA,K., YAMAGUCHI,K., KOHDA,E., et al. (2000). Longitudinal follow-up study of smoking-induced lung density changes by high-resolution computed tomography. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **161**, 1264-1273.

Ref Type: Journal

SOYER,O.U., DIZDAR,E.A., KESKIN,O., LILLY,C., and KALAYCI,O. (2006). Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy* **61**, 1016-1018.

Ref Type: Journal

STOCKLEY,R.A., BAYLEY,D.L., UNSAL,I., and DOWSON,L.J. (2002). The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am. J Respir. Crit Care Med.* **165**, 1494-1498.

Ref Type: Journal

STOCKLEY,R.A., HILL,A.T., HILL,S.L., and CAMPBELL,E.J. (2000). Bronchial inflammation: its relationship to colonizing microbial load and alpha(1)-antitrypsin deficiency. *Chest* **117**, 291S-293S.

Ref Type: Journal

STOLK,J., PUTTER,H., BAKKER,E.M., et al. (2007). Progression parameters for emphysema: a clinical investigation. *Respir. Med.* **101**, 1924-1930.

Ref Type: Journal

STOLLER,J.K., ROUHANI,F., BRANTLY,M., et al. (2002). Biochemical efficacy and safety of a new pooled human plasma alpha(1)-antitrypsin, Respitin. *Chest* **122**, 66-74.

Ref Type: Journal

STOLLER,J.K., SMITH,P., YANG,P., and SPRAY,J. (1994). Physical and social impact of alpha 1-antitrypsin deficiency: results of a survey. *Cleve. Clin. J. Med.* **61**, 461-467.

Ref Type: Journal

STOLLER,J.K., SNIDER,G.L., BRANTLY,M.L., et al. (2005). [American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and

management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Pneumologie* **59**, 36-68.

Ref Type: Journal

SVEGER,T. (1978). alpha 1-antitrypsin deficiency in early childhood. *Pediatrics* **62**, 22-25.

Ref Type: Journal

TATE,S., MACGREGOR,G., DAVIS,M., INNES,J.A., and GREENING,A.P. (2002). Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* **57**, 926-929.

Ref Type: Journal

TECKMAN,J.H. and PERLMUTTER,D.H. (1996a). The endoplasmic reticulum degradation pathway for mutant secretory proteins alpha1-antitrypsin Z and S is distinct from that for an unassembled membrane protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 13215-13220.

Ref Type: Journal

TECKMAN,J.H., QU,D., and PERLMUTTER,D.H. (1996b). Molecular pathogenesis of liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* **24**, 1504-1516.

Ref Type: Journal

TOBIN,M.J., COOK,P.J., and HUTCHISON,D.C. (1983). Alpha 1 antitrypsin deficiency: the clinical and physiological features of pulmonary emphysema in subjects homozygous for Pi type Z. A survey by the British Thoracic Association. *Br. J. Dis. Chest* **77**, 14-27.

Ref Type: Journal

TRAVIS,J. (1988). Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am. J. Med.* **84**, 37-42.

Ref Type: Journal

VAN BEURDEN,W.J., DEKHUIJZEN,P.N., HARFF,G.A., and SMEENK,F.W. (2002). Variability of exhaled hydrogen peroxide in stable COPD patients and matched healthy controls. *Respiration* **69**, 211-216.

Ref Type: Journal

VAN,F.R., KRAMPS,J.A., VAN DER PUTTEN,A.B., KROM,R.A., and GIPS,C.H. (1986). Change in alpha 1-antitrypsin phenotype after orthotopic liver transplant. *Clin. Exp. Immunol.* **66**, 669-672.

Ref Type: Journal

VAN,S.W. (1993). Alpha 1-antitrypsin deficiency: an overview. *Acta Clin. Belg.* **48**, 171-189.

Ref Type: Journal

VASS,G., HUSZAR,E., BARAT,E., et al. (2003). Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **167**, 850-855.

Ref Type: Journal

VAUGHAN,J., NGAMTRAKULPANIT,L., PAJEWSKI,T.N., et al. (2003). Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur. Respir. J.* **22**, 889-894.

Ref Type: Journal

VOGELBERG,C., HIRSCH,T., ROSEN-WOLFF,A., KERKMANN,M.L., and LEUPOLD,W. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* cannot be detected by PCR in the breath condensate of patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **36**, 348-352.

Ref Type: Journal

VOGELMEIER,C. and ET AL. (2007). **Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD) 2007.** *Pneumologie* 2007 **61**, e1-e40.

Ref Type: Journal

VOLPERT,D., MOLLESTON,J.P., and PERLMUTTER,D.H. (2000). Alpha1-antitrypsin deficiency-associated liver disease progresses slowly in some children. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **31**, 258-263.

Ref Type: Journal

WALL,M., MOE,E., EISENBERG,J., POWERS,M., BUIST,N., and BUIST,A.S. (1990). Long-term follow-up of a cohort of children with alpha-1-antitrypsin deficiency. *J. Pediatr.* **116**, 248-251.

Ref Type: Journal

WARTER,J., STORCK,D., GROSSHANS,E., METAIS,P., KUNTZ,J.L., and KLUMPP,T. (1972). [Weber-Christian syndrome associated with an alpha-1 antitrypsin deficiency. Familial investigation]. *Ann. Med. Interne (Paris)* **123**, 877-882.

Ref Type: Journal

WEISS,S.J., LAMPERT,M.B., and TEST,S.T. (1983). Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* **222**, 625-628.

Ref Type: Journal

WENCKER,M., BANIK,N., BUHL,R., SEIDEL,R., and KONIETZKO,N. (1998). Long-term treatment of alpha1-antitrypsin deficiency-related pulmonary emphysema with human alpha1-antitrypsin. *Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft zur Therapie*

von Lungenerkrankungen (WATL)-alpha1-AT-study group. Eur. Respir. J. **11**, 428-433.
Ref Type: Journal

WEWERS,M.D., CASOLARO,M.A., SELLERS,S.E., et al. (1987). Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema. N. Engl. J. Med. **316**, 1055-1062.
Ref Type: Journal

WOOLHOUSE,I.S., BAYLEY,D.L., and STOCKLEY,R.A. (2002). Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. Thorax **57**, 709-714.
Ref Type: Journal

WULFSBERG,E.A., HOFFMANN,D.E., and COHEN,M.M. (1994). Alpha 1-antitrypsin deficiency. Impact of genetic discovery on medicine and society. JAMA **271**, 217-222.
Ref Type: Journal

YAMAMOTO,Y., SAWA,R., OKAMOTO,N., MATSUI,A., YANAGISAWA,M., and IKEMOTO,S. (1986). Deletion 14q(q24.3 to q32.1) syndrome: significance of peculiar facial appearance in its diagnosis, and deletion mapping of Pi(alpha 1-antitrypsin). Hum. Genet. **74**, 190-192.
Ref Type: Journal

ZHOU,H. and FISCHER,H.P. (2000a). [Liver changes in heterozygote alpha 1-antitrypsin deficiency PiZ]. Pathologie **21**, 433-440.
Ref Type: Journal

ZHOU,H. and FISCHER,H.P. (1998). Liver carcinoma in PiZ alpha-1-antitrypsin deficiency. Am. J. Surg. Pathol. **22**, 742-748.
Ref Type: Journal

ZHOU,H., ORTIZ-PALLARDO,M.E., KO,Y., and FISCHER,H.P. (2000b). Is heterozygous alpha-1-antitrypsin deficiency type PIZ a risk factor for primary liver carcinoma? Cancer **88**, 2668-2676.
Ref Type: Journal

ZIHLIF,N., PARASKAKIS,E., TRIPOLI,C., LEX,C., and BUSH,A. (2006). Markers of airway inflammation in primary ciliary dyskinesia studied using exhaled breath condensate. Pediatr. Pulmonol. **41**, 509-514.
Ref Type: Journal

9 Anhang

- Patientenaufklärung
- Patienteneinwilligung
- Patientenfragebogen
- Lebenslauf
- Präsentationen und Publikationen
- Verzeichnis meiner akademischen Lehrer
- Danksagung
- Ehrenwörtliche Erklärung

Patienteninformation zur
Pilotstudie zum Nachweis von alpha 1 Antitrypsin im
Atemwegskondensat von Gesunden Nichtrauchern, Rauchern, COPD
Patienten und substituierten alpha 1 Antitrypsinpatienten und
Bronchialkarzinom Patienten

Studienleiter:
Dr. A-Rembert Koczulla
an der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie der Philipps Universität
Marburg, Baldingerstraße 1,
35033 Marburg, Tel (06421) .286 5078

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient, sehr geehrte(r) Proband(in)

wir bitten Sie für die Durchführung einer Studie um Ihre Mithilfe. Wir untersuchen die Konzentration von alpha 1 Antitrypsin (α 1AT) und den pH Wert in der ausgeatmeten Luft. Bei α 1AT handelt es sich um ein Protein, das bei Entzündung hochreguliert und weiterhin wichtig ist, um Proteine unschädlich zu machen, die während des Rauchens entstehen und die Lungenstruktur angreifen und zersetzen. Es gibt eine Erkrankung (α 1AT-Mangel) bei der dieses Protein nicht oder in infunktioneller Form produziert wird. Patienten, die diese Erkrankung haben, erkranken sehr früh an einem Lungenemphysem (Lungenüberblähung mit Verlust von Lungengewebe). Ziel dieser Studie ist es in der Ausatemluft dieses Protein zu messen und die Messwerte bei Gesunden, gesunden Rauchern, COPDlern und Bronchialkarzinompatienten und Patienten mit α 1AT Mangel, die das Protein über die Vene 1x die Woche zugeführt bekommen zu vergleichen.

Der pH Wert in dem Atemwegskondensat gibt Hinweise auf Entzündungsvorgänge in den Atemwegen.

Die an der Studie teilnehmenden Patienten sollen 1-2 Mal mit dem unten zu sehenden Gerät Atemwegskondensat sammeln, was sehr einfach ist. Es erfolgt eine pseudonymisierte Speicherung der Daten, d.h. Ihre persönlichen Daten werden verschlüsselt gespeichert, z.B. wird Ihnen ein Zahlencode oder eine Buchstabenkombination zugewiesen. Nur mit Hilfe einer speziellen Liste (Schlüsselliste), kann von den pseudonymisierten Daten auf Ihre Person rückgeschlossen werden. Diese Schlüsselliste wird am Ende der Studie vernichtet. Zu der Schlüsselliste hat nur der

Studienleiter Zugang. Die Liste wird in einem abschließbaren Stahlschrank gelagert. Sollten Daten veröffentlicht werden, ist nicht auf Ihre Person rückzuschließen.

Der Zeitaufwand für das Sammeln der Ausatemluft beträgt ca. 15 min

Die Blutentnahme dauert ca. 1 min.

Lungenfunktionsdauer ca. 10 min

Ausfüllen von Fragebogen und Einverständniserklärung ca. 5 min

Insgesamt Zeitaufwand ca. 30 min

Das Folgende gilt nur für Patienten mit α 1AT-Mangel

Von Patienten/innen, die einen bekannten α 1AT-Mangel wollen wir am Tag 1/3/6 nach Substitution Atemwegskondensatuntersuchungen durchführen, um einen individuellen Verlauf zu beschreiben. Diese sollen mit den Blutserumkonzentrationen verglichen werden. Das macht insgesamt 3 Blutentnahmen an drei Besuchstagen für Patienten mit homozygotem α 1AT-Mangel notwendig (Tag 1, 3, 6).

Dauer Tag 1:

Der Zeitaufwand für das Sammeln der Ausatemluft beträgt ca. 15 min

Die Blutentnahme dauert ca. 1 min.

Lungenfunktionsdauer ca. 10 min

Ausfüllen von Fragebogen und Einverständniserklärung ca. 5 min

Zeitaufwand => ca. 30 min

Dauer Tag 3/6

Der Zeitaufwand für das Sammeln der Ausatemluft beträgt ca. 15 min

Die Blutentnahme dauert ca. 1 min.

Zeitaufwand => ca. 15 min



Wir bitten Sie dabei um Ihre Mithilfe.

Selbstverständlich erfolgt Ihre Teilnahme an der Studie freiwillig. Es steht Ihnen frei, Ihr Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen zu widerrufen, wodurch Ihnen keinerlei Nachteile entstehen würden.

Falls Sie weitere Fragen haben sollten, können Sie jederzeit den Studienleiter, Herrn Dr. A-Rembert Koczulla erreichen.

Dr. A-Rembert Koczulla

Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Pneumologie

Tel. +49 (0) 6421. 286 5078

Patienteneinwilligung

Ich, _____, geb. am _____

wohnhaft in _____
PLZ _____ Ort _____ Telefon _____

wurde von

Herrn/ Frau _____ über Ziel und Ablauf der Studie:

Pilotstudie zum Nachweis von alpha 1 Antitrypsin im Atemwegskondensat von Gesunden Nichtrauchern, Rauchern, COPD Patienten und substituierten alpha 1 Antitrypsinpatienten

Ich wurde vonüber die obige Studie aufgeklärt. Die Aufklärung wurde mir zusätzlich schriftlich in Form einer Patienteninformation übergeben. Ich habe den Inhalt der Aufklärung verstanden und zur Kenntnis genommen, dass ich bei weiteren Fragen jederzeit meinen behandelnden Arzt oder den Studienleiter (Dr. AR Koczulla an der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie der Philipps Universität Marburg, Baldingerstraße, 35033 Marburg, Tel +49 (0) 6421 2865078) ansprechen kann. Mir ist bekannt, dass ich die Untersuchung jederzeit, ohne Nennung von Gründen und ohne persönliche Nachteile, beenden kann. Ich werde dies meinem behandelnden Arzt sofort mitteilen.

Eine Kopie der Patienteninformation wurde mir ausgehändigt.

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur freiwilligen Teilnahme an der Untersuchung.

Ort, Datum

Unterschrift des Patienten

Ort, Datum

Aufklärender Arzt

Fragebogen AAT-EBC

Name, Aufkleber:

Mann/Frau

Geburtsdatum:

Datum (heute)

Adresse:

Uhrzeit (jetzt)

Tel. Nr.

Einverständniserklärung: j/n

Lufu: j/n

BE: j/n

Fragebogen: j/n

Serum für IEF: j/n

Letzte Medikation (Einnahmezeit):

Letzte Mahlzeit (Einnahmezeit):

Ekzem:	seit wann	Beschwerden	Medikation
---------------	-----------	-------------	------------

Rhinitis	seit wann	Beschwerden	Medikation
-----------------	-----------	-------------	------------

Asthma	seit wann	Beschwerden	Medikation
---------------	-----------	-------------	------------

Allergie/n	seit wann	Beschwerden	Medikation
-------------------	-----------	-------------	------------

Behandlung:	Hausarzt	Spezialist
--------------------	----------	------------

Rauchen	seit wann	Päckchen/d	PY	aufgehört
----------------	-----------	------------	----	-----------

Letzte Zigarette (Uhrzeit, Datum)

Letzte Erkältung	seit wann	Beschwerden	Medikation
-------------------------	-----------	-------------	------------

Letzter Urlaub	wann	wo
-----------------------	------	----

Tumor:	Histo	Beschwerden	Therapie
---------------	--------------	--------------------	-----------------

Andere Studien

Eingenommene Medikamente

Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Vor- und Zuname</i>	Sarah Elisabeth Noeske
<i>Geburtsdatum, -ort</i>	geb. am 16.08.1983 in Bad Soden, Deutschland
<i>Staatsangehörigkeit</i>	deutsch
<i>Familienstand</i>	ledig, keine Kinder

Schulischer Werdegang

07/1989 – 08/1993	Albert-von-Reinach Grundschule, Kelkheim i.Ts.
09/1993 – 07/2002	Landgraf-Ludwig-Gymnasium, Gießen
07/2002	Abitur

Beruflicher Werdegang

seit 2002	Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
08/2004	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
<i>Famulaturen:</i>	
08/2005	Innere Medizin: Krankenhaus am Balserischen Stift, Gießen
03/2006	Gynäkologie und Geburtshilfe: Klinikum Kassel
08/2006	Gynäkologie und Geburtshilfe: North York General Hospital, Toronto, Kanada
03/2007	Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie, Praxis Dr. G. Noeske, Gießen

02/2008 – 01/2009

Praktisches Jahr:

- 1) Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
- 2) Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
- 3) Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie und Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

06/2009

seit 08/2009

Staatsexamen Humanmedizin

Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin
Schwerpunkt Pneumologie, Prof. Vogelmeier,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg

Promotion

seit 01/ 2007

Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt
Pneumologie, Universitätsklinikum Gießen und
Marburg, Standort Marburg

Titel: „Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in
Exhalierem Atemwegskondensat“

Betreuer Prof. Dr. med. Dr. rer .nat. Robert Bals
und Dr. med. Rembert Koczulla

Praktische Tätigkeiten

2004 – 2007

Tätigkeit als studentische Hilfskraft im
Schlafmedizinischen Labor des
Universitätsklinikums Marburg

Präsentationen und Publikationen

- 04/2008 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pulmologie, Lübeck,
Deutschland: Temperatureinfluss auf den pH-Wert in
Exhaliertem Atemwegskondensat.
S. Noeske, R. Bals, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla.
- 05/2008 ATS 2008, International Conference, Toronto, Canada: Influence of
ambient temperature on pH-value in exhaled breath condensate.
S. Noeske, F. Dette, R. Bals, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla.
- 10/2008 ERS 2008, Annual Congress of the European Respiratory Society, Berlin,
Deutschland: Alpha-1-Antitrypsin is detectable and can be quantified in
exhaled breath condensate.
S. Noeske, R. Bals, C. Herr, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla.
- 10/2009 Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled
breath condensate in current smokers.
Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Jörres RA, Römmelt H, Vogelmeier C,
Bals R.; Respiration. 2010;79(1):61-7. Epub 2009 Oct 6.
- 11/2009 Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate.
Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Dette F, Pinkenburg O, Schmid S,
Jörres RA, Vogelmeier C, Bals R.; Respirology. 2010 Jan; 15(1):155-9.
Epub 2009 Nov 23.
- 11/2009 Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für
Pneumologie 2009, Borstel, Deutschland: Akute und chronische Effekte
von Zigarettenrauch auf Inflammationsmarker im Atemwegskondensat bei
Rauchern.
Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Jörres RA, Römmelt H, Vogelmeier C,
Bals R.

-
- 05/2010 ATS 2010, International Conference, New Orleans, USA: An electronic nose distinguishes the exhaled breath condensates obtained by two different devices and two different breath patterns.
S. Noeske, A. Hattesoehl, R. Joerres, T. Greulich, R. Bals, C. Vogelmeier, AR. Koczulla.
- 09/2010 ERS 2010, Annual Congress of the European Respiratory Society, Barcelona, Spain: Smokers have elevated Alpha-1-Antitrypsin-values in exhaled breath condensate compared to healthy controls.
S. Noeske, A. Hattesoehl, T. Greulich, R. Bals, C. Vogelmeier, A.R. Koczulla.
- 10/2010 Alpha-1- Antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients.
Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Joerres R, Vogelmeier C, Bals R.
Eingereicht.
- 10/2010 Discrimination between chronic obstructive pulmonary disease and alpha 1-antitrypsin deficiency using an electronic nose.
Akira D. M. Hattesoehl, Rudolf A. Jörres, Holger Dressel, Severin Schmid, Claus Vogelmeier, Timm Greulich, Sarah Noeske, Robert Bals and Andreas Rembert Koczulla
Eingereicht.
- 10/2010 Comparison of Two Devices and Two Breathing Patterns for Exhaled Breath Condensate sampling.
Eva-Maria Hüttmann, Timm Greulich, Akira Hattesoehl, Severin Schmid, Sarah Noeske, Gerrit John, Rudolf Jörres, Bernd Müller, Claus Vogelmeier, Robert Bals, A.-Rembert Koczulla
In Bearbeitung.

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Albert, Al-Fakhri, Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Behr, Beyer, Bien, Bolm, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges, Donner-Banzhoff, Dünne, Duda, Feiber, Feuser, Funck, Gerdes, Geyer, Görg C., Görg K., Grau, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hassan, Henzel, Hermann-Lingen, Hertl, Jungclas, Kann, Kalder, Keller, Kill, Klose, Koch, Koczulla, König, Koolmann, Krause, Krieg, Kroll, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lübbe, Maisch, Max, Moosdorf, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Roelke, Röper, Rothmund, Ruchholz, Rudolph, Schade, Schäfer, Schnabel, Schrader, Schulze, Seitz, Seyberth, Seyfarth, Steiniger, Stempel, Sundermeyer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals möchte ich herzlich danken für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen seines Institutes zu verwirklichen, sowie für die prompte und konstruktive Korrektur dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Rembert Koczulla für die intensive und kompetente wissenschaftliche Betreuung und stets motivierende Unterstützung bei der Durchführung meines Projektes sowie die Vermittlung von Freude an der wissenschaftlichen Arbeit.

Christian Herr danke ich für die tatkräftige Unterstützung, Anleitung und sein großes Engagement bei der Durchführung aller Versuche, ohne die eine Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke besonders Annette Püchner und Akira Hattesoht sowie der ganzen AG Bals für ihre große Hilfe, dass sie mir stets mit Rat und Tat beiseite standen und natürlich für die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken für ihre immerwährende Geduld und ihr Verständnis, sowie für die moralische, seelische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotionszeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Nachweis von Alpha-1-Antitrypsin in exhaltem Atemwegskondensat“ in der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals mit Unterstützung durch Dr. med. Andreas Rembert Koczulla ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden (oder werden) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

1. Acute and chronic effects of smoking on inflammation markers in exhaled breath condensate in current smokers. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Jörres RA, Römmelt H, Vogelmeier C, Bals R.; Respiration. 2010;79(1):61-7. Epub 2009 Oct 6.
2. Ambient temperature impacts on pH of exhaled breath condensate. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Dette F, Pinkenburg O, Schmid S, Jörres RA, Vogelmeier C, Bals R.; Respirology. 2010 Jan; 15(1):155-9. Epub 2009 Nov 23.
3. Discrimination of COPD and α_1 -antitrypsin patients with an electronic nose. Hattesoehl A, Joerres R, Dressel H, Schmid S, Vogelmeier C, Greulich T, Noeske S, Bals R, Koczulla AR. Eingereicht.
4. Alpha-1- Antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients. Koczulla AR, Noeske S, Herr C, Joerres R, Vogelmeier C, Bals R. Eingereicht.

Ort, Datum, Unterschrift